



TITLE:

スキャフォールドタンパク質 WDR46の核小体サブドメイン形成 における役割(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

平井, 悠哉

CITATION:

平井, 悠哉. スキャフォールドタンパク質WDR46の核小体サブドメイン形成における役割. 京都大学, 2013, 博士(生命科学)

ISSUE DATE:

2013-09-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k17929>

RIGHT:

許諾条件により要旨・本文は2014-09-01に公開

スキャフォールドタンパク質 WDR46 の核小体サブドメイン形成における役割

平井 悠哉

要旨

細胞核には核内ドメインと呼ばれる膜を持たない構造体が多数存在し、それぞれが細胞核内において独自の役割を果たしている。核小体は最大の核内ドメインであり、主な機能であるリボソームの生合成は、その構造と密接に関連している。しかし、その構造形成の詳細なメカニズムは明らかにはなっていない。そこで本研究では、細胞核の構造維持に参与していることが示唆されている核マトリクス、および核マトリクスタンパク質群の特徴として明らかになった天然変性領域に着目し、核小体の構造形成の詳細なメカニズムを明らかにすることを目指した。第 1 章の序論に引き続き、第 2 章では複数の核小体局在性核マトリクスタンパク質の核小体局在機構を明らかにし、第 3 章では取り上げたタンパク質の中から WDR46 というタンパク質にさらに焦点を当て、その核小体構造に与える寄与を明らかにした。主な結果は以下の通りである。

- (1) 核小体に局在する 9 種の核マトリクスタンパク質の GFP 融合欠失変異体を作製し、それら欠失変異体の示した局在と天然変性領域の有無との関係を調べた。その結果、着目したタンパク質の核小体局在には天然変性領域が重要な役割を果たしていることが明らかになった。(第 2 章)
- (2) (1)でその核小体局在と天然変性領域の相関が顕著に高かった WDR46 に着目し、そのタンパク質が核小体構造に与える寄与を詳細に調べた。その結果、WDR46 はその結合パートナーと自身の天然変性領域を介して相互作用していることが明らかになった。また、WDR46 の核小体局在は DNA および RNA とともに非依存的であった。さらには WDR46 をノックダウンした際には、結合パートナーであり正常時には核小体の granular component (GC)に局在した nucleolin および DDX21 (18S rRNA のプロセシングに関わる因子)は核小体の縁にその局在を変化させた一方で、同様に結合パートナーであり正常時には GC に局在した NOP2 および EBP2 (28S rRNA のプロセシングに関わる因子)はその局在を変化させなかった。以上の結果から、核小体の GC はさらに 2 つの領域に分けられること、WDR46 はその一方の領域のスキヤフォールドとして機能していること、さらに、その機能の本質は天然変性領域による相互作用であることが明らかになった。(第 3 章)

以上の結果のまとめ、および将来の展望を第 4 章に記した。本研究では核小体の構造構築の詳細なメカニズム解明に対し、天然変性領域による相互作用に着眼点を当て、構造形成の一つのモデルを打ち立てた。このような着眼点、および打ち立てたモデルは今後、核内ドメインの構造に関する研究において有用となるものであろう。

謝辞

竹安邦夫教授に心から感謝の意を表します。大学 2 回生の後期のある日、竹安教授の担当する生化学の講義の受講後、教授室にふと呼ばれました。そこで細胞核の研究を（ウィスキーを片手に）熱く語られ、そこから私の研究生活が始まりました。それから今日に至るまで、研究とはどういうものか、どのように進めていけばよいか、等、研究全般に関して毎日のように懇切丁寧に指導してくださりました。国際学会で研究成果を発表する機会も多数与えてくださり、その際にも発表の仕方から他の研究者との接し方までご指導くださいました。申請書作成や論文執筆の際にも大きく時間を割いていただき、論文の執筆に至っては何度も何度も加筆・修正していただきました。また、アメリカの UCLA およびスコットランドの Dundee 大学に派遣していただき、海外で研究生活を送る機会も与えてくださいました。この経験は私にとって大きな財産となっています。さらに、一度研究の世界から離れた私に対し、研究の世界に戻ることをご提案いただき、研究室の一員として私を引き受けてくださいました。このことに関しては、どれほど感謝してもしきれません。研究の指導者としてだけでなく、人生の指導者としても竹安教授に感謝するとともに深く敬意を表します。

吉村成弘准教授に深く感謝いたします。研究の方向性等に関し、数多くのアドバイスをいただきました。研究会では研究者を目指すものとしての立ち居振る舞いを教えてくださり、各種報告書の作成の際には基本的なことから細かいことまで逐一ご指導くださいました。また研究に行き詰っている時には、ちょっとした提案とともにさりげなく声をかけてくださり、そのお声掛けが研究停滞からの脱却につながることも少なくありませんでした。ここに改めて吉村准教授に感謝の意を表するとともに、深く敬意を表します。

糸田昌宏助教には、具体的な研究の方法に関して多数のアドバイスをしていただきました。特に培養細胞を用いた実験系では、数多くの的確なご助言をいただきました。論文執筆の際には加筆・修正を繰り返ししていただき、最後の最後まで議論にお付き合いいただきました。また、メンタルな面でも非常に大きな支えとなっていただきました。研究推進の支えとなってくださった糸田助教に深く感謝いたします。

共同研究者である新潟大学の堀米恒好教授には、数多くの DNA コンストラクトを提供して下さっただけでなく、論文執筆の際には非常に有意義なご意見を数多くいただきました。また、年に一度行っていた研究打ち合わせの際には、夜遅くまで研究の議論にお付き合いくださりました。私の研究の一翼を担ってくださった堀米教授に深く感謝の意を表します。

生命科学研究科の石川冬木教授および渡邊祐三氏には質量分析およびその解析をしていただきました。この質量分析による解析により、行き詰っていた研究に道が開けました。ここに深く感謝の意を表します。

竹安研究室在籍時のメンバーに深く感謝いたします。Emilie Louvet 博士には論文作成の際、実験のデザインおよび原稿の加筆・修正で大変お世話になりました。小田俊之氏にはバイオインフォマティクスの解析を行っていただきました。村田圭氏には顕微鏡による画像取得に協力していただきました。円山由郷博士、高橋博英博士、大塚正太郎博士には研究室の先輩として様々なご指導をいただきました。同級生であった鈴木勇輝博士には議論にお付き合いいただくとともに、様々な相談にも乗っていただきました。また、その他数多くのメンバーと有意義な時間を共有させていただきました。また、私の学位に関することとで時間を割いていただいた現在の竹安研究室のメンバーにも深く感謝いたします。

今日に至るまで私のことを温かく見守り、経済的、精神的にも支えてくださった両親に深く感謝いたします。

最後になりましたが、私と人生を共に歩むことを決断して下さい、日々心の支えとなっ
ていただいている妻、その笑顔で毎日の疲れを癒してくれている愛娘に感謝いたします。

略歴

生誕

1983 年 5 月 28 日 大阪府

学歴

1999 年 4 月～2002 年 3 月

大阪府立天王寺高校理数科

2003 年 4 月～2007 年 3 月

京都大学総合人間学部総合人間学科

2007 年 4 月～2009 年 3 月

京都大学生命科学研究科 修士課程

2009 年 4 月～2012 年 3 月

京都大学生命科学研究科 博士後期課程

教育歴

2007 年 4 月～2010 年 3 月

京都大学生命科学研究科ティーチングアシスタント

2007 年度、2008 年度、2009 年度、2010 年度

スーパーサイエンスハイスクール（西大和学園高校）ティーチングアシスタント

2009 年 4 月～2011 年 3 月

新大阪歯科衛生士専門学校 非常勤講師

研究歴

2009 年 4 月～2012 年 3 月

日本学術振興会特別研究員(DC1)

2012 年 8 月～2012 年 3 月

京都大学大学院生命科学研究科 教務補佐員

2013 年 4 月～現在

京都大学ウイルス研究所 教務補佐員

論文目録

1. Y. Hirano, H. Takahashi, M. Kumeta, K. Hizume, Y. Hirai, S. Otsuka, S.H. Yoshimura, and K. Takeyasu
Nuclear architecture and chromatin dynamics revealed by atomic force microscopy in combination with biochemistry and cell biology.
Pflügers Archiv European Journal of Physiology, Springer Berlin, **456**, pp139-153 (2008)
2. Y. Hirai, E. Louvet, T. Oda, M. Kumeta, Y. Watanabe, T. Horigome, and K. Takeyasu
Nucleolar Scaffold Protein, WDR46, Determines the Granular Compartmental Localization of Nucleolin and DDX21
Genes to Cells, in press

学会発表

1. Y. Hirai, M. Kumeta, Y. Hirano, S.H. Yoshimura, and K. Takeyasu
Nucleolar Dynamics Revealed by Monoclonal Antibodies Against Specific Structural Regions of the Nucleus
The American Society for Cell Biology 46th Annual Meeting
B455, San Diego, USA (December 2006)
2. Y. Hirai, M. Kumeta, Y. Hirano, S.H. Yoshimura, and K. Takeyasu
Nucleolar Dynamics Revealed by Monoclonal Antibodies Against Specific Structural Regions of the Nucleus
Functional Organization of the Nucleus
P21, Awaji, Japan (January 2007)
3. Y. Hirai, Y. Hirano, M. Kumeta, and K. Takeyasu
Structural and Functional Domains of a Nucleolar Protein, NO66.
The American Society for Cell Biology 48th Annual Meeting
B497, San Francisco, USA (December 2008)
4. Y. Hirai, Y. Hirano, M. Kumeta, and K. Takeyasu
The nucleolar localization mechanism of NO66, the protein which would be the foundation of nucleolus

The 4th NTU-Kyoto U Mini-Symposium on Molecular and Cell Biology
Oral presentation, Taipei, Taiwan (January 2009)

5. Yuya Hirai, Toshiyuki Oda, Shengyi Xia, Nanase Araki, Norihito Sato, Tsuneyoshi Horigome and Masahiro Kumeta
A proteomic and bioinformatic approach to indentify the nuclear scaffolding proteins
The 82th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society (Oct. 2009, Kobe, Japan)
6. Yuya Hirai, Masahiro Kumeta, Toshiyuki Oda, Shengyi Xia, and Kunio Takeyasu
Characterization of a novel actin-associated protein, C19orf21
The 10th AEARU Molecular Biology and Biotechnology Workshop (Nov. 2009, Taipei, Taiwan)
7. 平井悠哉、糸田昌宏、吉村成弘、堀米 恒好、竹安邦夫
核小体に局在する難溶性核マトリクスタンパク質、WDR46 の機能解析
第9回 核ダイナミクス研究会
P53, Shizuoka, Japam (May 2010)
8. Yuya Hirai, Masahiro Kumeta, and Tsuneyoshi Horigome
Functional analysis of a newly identified nuclear matrix protein, WDR46
The 6th Kyoto U-NTU mini Symposium
Oral presentation, Kyoto University, Japan, (June, 2010)

著書

1. 堀米恒好、古川和広、糸田昌宏、平井悠哉、竹安邦夫
核マトリクスタンパク質
生体の科学 「細胞核—構造と機能」 62 (5): 402-403, (2011)

目次

要旨	．．． i
謝辞	．．． ii
略歴	．．． v
論文目録	．．． vi
学会発表	．．． vi
目次	．．． viii
図表一覧	．．． x
略語一覧	．．． xi

第1章：序論

(1.1) 核内ドメイン	．．． 1
(1.2) 核マトリクス	．．． 2
(1.3) 核小体	．．． 3
(1.4) 本研究の目的	．．． 4

第2章：核小体構造タンパク質の核小体局在機構

(2.1) 導入	．．． 6
(2.2) 結果	
(2.2.1) 着目した核マトリクスタンパク質の核小体局在機構	．．． 7
(2.2.2) 核小体局在機構と天然変性領域の関連性	．．． 9
(2.3) 考察	
(2.3.1) 核小体局在機構	．．． 10
(2.3.2) 核マトリクスタンパク質における天然変性領域が核小体構造に及ぼす影響	．．． 11

第3章：WDR46の核小体内組織化への関与

(3.1) 導入	．．． 13
(3.2) 結果	
(3.2.1) WDR46の結合タンパク質の同定	．．． 13
(3.2.2) WDR46複合体におけるRNAの関与	．．． 14
(3.2.3) 天然変性領域の持つ分子間相互作用のハブとしての機能	．．． 15
(3.2.4) WDR46は核小体のスキャフォールドタンパク質である。	．．． 16
(3.2.5) WDR46はNucleolinおよびDDX21の核小体局在の基盤として機能する。	

	・ ・ ・	17
(3.3) 考察		
(3.3.1) GC の微細領域	・ ・ ・	19
(3.3.2) スキャフォールドタンパク質、WDR46	・ ・ ・	20
第 4 章：結び		
(4.1) 核小体構造構築機構	・ ・ ・	22
(4.2) 今後の展望	・ ・ ・	22
材料と方法	・ ・ ・	24
参考文献	・ ・ ・	33

図表一覧

図 1	細胞核内に存在する種々の核内ドメイン	・・・	39
図 2	核小体の内部構造	・・・	40
図 3	BXDC1 の核小体局在機構	・・・	41
図 4	WDR46 の核小体局在機構	・・・	42
図 5	NOL10 の核小体局在機構	・・・	43
図 6	WDSOF1 の核小体局在機構	・・・	44
図 7	EBP2 の核小体局在機構	・・・	45
図 8	RRS1 の核小体局在機構	・・・	46
図 9	GIYD1 の核小体局在機構	・・・	47
図 10	MAK16 の核小体局在機構	・・・	48
図 11	KIAA0409 の核小体局在機構	・・・	49
図 12	着目したタンパク質の核小体局在機構とそれらの天然変性領域との関係	・・・	50
図 13	WDR46 のドメイン構造およびその局在	・・・	53
図 14	WDR46 の結合タンパク質の同定	・・・	54
図 15	内在性の WDR46 とその結合パートナーとの相互作用	・・・	55
図 16	WDR46 複合体に対する RNA の関与	・・・	56
図 17	WDR46 は自身の天然変性領域を介して結合パートナーと相互作用する。	・・・	57
図 18	WDR46 は高度に難溶性の核小体タンパク質である。	・・・	58
図 19	WDR46 は RNase A を先に作用させる代替法でも難溶性画分に残るタンパク質である。	・・・	60
図 20	WDR46 のノックダウンによる nucleolin および DDX21 の局在変化	・・・	62
図 21	分裂期における核小体再構築の際の、WDR46 と 2-30C 抗原との挙動の比較・・・	63	
図 22	分裂期における核小体再構築の際の、WDR46 と fibrillarin との挙動の比較・・・	64	
図 23	分裂期における核小体再構築の際の、WDR46 と nucleolin との挙動の比較・・・	65	
図 24	WDR46 は分裂期終了に伴う nucleolin および DDX21 の新生核小体への正常な集積を決定している。	・・・	66
図 25	WDR46 は分裂期終了に伴う fibrillarin の新生核小体への正常な集積には関与していない。	・・・	68
図 26	核小体スキャフォールドのモデル図	・・・	70
表 1	質量分析法により同定された WDR46 の結合タンパク質の候補	・・・	72

略語一覽

DFC: dense fibrillar component

emPAI: exponentially modified protein abundance index

ETS: external transcribed spacer

FC: fibrillar center

FLIP: fluorescence loss in photobleaching

FRAP: fluorescence recovery after photobleaching

GC: granular component

ITS: internal transcribed spacer

mRNA: messenger RNA

NoLS: nucleolar localization signal

NORs: nucleolar organizer regions

PML: promyelocytic leukemia

PNBs: prenucleolar bodies

rDNA: ribosomal DNA

rRNA: ribosomal RNA

SSU: small subunit

第1章：序論

(1.1) 核内ドメイン

細胞核は遺伝物質である DNA を包含している細胞小器官である。DNA は細胞核内において特定のタンパク質と複合体を形成し、クロマチンと呼ばれる構造をとっている。クロマチンの最も基本的な単位構造はヌクレオソームであり、H2A、H2B、H3、H4 の4種のコアヒストンからなるヒストン8量体に DNA が約 147bp 巻きついたものが繰り返され、beads-on-string とよばれる構造をしている (Kornberg, 1974; Oudet et al., 1975)。4種のコアヒストンに加え、リンカーヒストンと呼ばれるヒストンバリエントである H1 の働きにより、30nm のクロマチンファイバーを形成している (Rattner and Hamkalo, 1979; Thoma et al., 1979)。遺伝子の発現はこのクロマチンを基に行われており、クロマチンは細胞核内において非常に重要な役割を果たしている構造体であると言ってよい。

しかし細胞核内に存在する構造体はクロマチンだけではない。位相差顕微鏡で容易に観察できる核小体をはじめ、細胞核内には核内ドメインと呼ばれるサブコンパートメントが多々存在する (Dundr and Misteli, 2001; Matera, 1999; Spector, 2003; Zhao et al., 2009) (図 1)。それら核内ドメインはそれぞれ特徴的な機能を有しており、例えば核小体におけるリボソームの生合成、核スペckルにおけるスプライソソームの貯蓄および集積、Cajal ボディにおける small RNA の成熟、パラスペckルにおける RNA の保持、等があげられる。また核内ドメインの多くは光学顕微鏡下では球状の形態として観察されるが、その大きさは大小さまざまであり、大きなものでは、核小体は約 3~8 μm 、核スペckルは約 2~3 μm 、小さなものでは、パラスペckルは 0.2~1 μm 、PML ホディは 0.1~1 μm の大きさを持つ。

それぞれ特定のタンパク質が存在し独自の機能を持つという意味では、核内ドメインは

古くから知られている細胞小器官と類似している。しかし、すべての核内ドメインに共通し、かつ古典的な細胞小器官との決定的な違いは、核内ドメインは膜を持たない構造体であるということである。核内ドメインは膜という明確な境界により区画された構造ではないことから、それらはタンパク質および RNA といった構成因子間の相互作用における定常状態の結果、構造体として存在していることが提唱されている (Misteli, 2001; Misteli, 2007)。それらの構造形成のメカニズムに関してはいくつかのモデルが提唱されているが (Mao et al., 2011)、その真偽は明らかにはなっていない。

(1.2) 核マトリクス

核マトリクスは、転写や複製、修復など細胞核で行われるイベントの足場として機能するタンパク質性の構造体であると考えられている。電子顕微鏡下では、単離した細胞核から調製された核マトリクスには繊維状構造が観察され、未処理の細胞核との違いが容易に確認される (Berezney and Coffey, 1974)。核内のクロマチンが所々にある足場を基にしてクロマチンループを形成しているという考えのもとに核マトリクスの存在が提案されており、分裂期の染色体からヒストンを取り除いて観察されたループ構造から (Paulson and Laemmli, 1977)、DNA を取り除くことによってクロマチンの足場の存在が明らかにされ (Adolphs et al., 1977; Paulson and Laemmli, 1977)、また間期の核マトリクスにおいても同様の足場の存在が明らかにされている (Vogelstein et al., 1980)。

核マトリクスを調製する方法は改善され (Fey et al., 1986)、Fey らの方法を用いて調製された核マトリクスタンパク質のプロテオーム解析からは、333 種の核マトリクスタンパク質が同定されている (Ishii et al., 2008)。核マトリクスが実際に細胞内に存在するかはいまだに明確な答えが出ていないが、核内構造体の空間的配置の決定に寄与していると考えられており (Pederson, 2000)、さらなる研究が求められている。

なお核マトリクスは調製の仕方によっては核スキャフォールドとも呼ばれるが、本論文では調製された構造体を”核マトリクス”と表記し、一般的に足場という意味をあらわす名詞として “スキャフォールド” という言葉を使用することにする。

(1.3) 核小体

核小体は最大の核内ドメインであり、直径 3~8 μ m の構造体である。主な機能はリボソームの生合成であるが、それに加え、細胞周期制御、ストレス応答、細胞老化、ウイルス因子の会合など、その機能は多岐にわたる (Boisvert et al., 2007; Carmo-Fonseca et al., 2000; Hiscox, 2007)。電子顕微鏡の観察によると、核小体の内部には、その中心部から fibrillar center (FC)、dense fibrillar component (DFC)、granular component (GC) という 3 つのサブドメインが存在する (Derenzini et al., 1990; Raska, 2003) (図 2)。この階層構造はリボソーム RNA (rRNA) の成熟の場と対応している。リボソーム DNA (rDNA) の転写の場に関しては未だ明確な答えは出ていないものの、rDNA の転写は FC と DFC の境界で、転写された rRNA の初期プロセッシングは DFC で、後期プロセッシングは GC で起こると提唱されている (Cheutin et al., 2002; Huang, 2002; Koberna et al., 2002)。すなわち、核小体はその構造と機能が密接に関連している構造体であると言える。

細胞周期のなかで、分裂期において核小体はその構造を劇的に変化させる。蛍光顕微鏡観察によると、分裂前期になると DFC や GC に局在していたタンパク質は核小体から拡散しはじめ、間期に見られていた核小体の構造は観察されなくなる。分裂期を通し、FC に局在していたタンパク質は rDNA の遺伝子クラスターに集積して nucleolar organizer regions (NORs) と呼ばれるドット状の構造体を形成する。ただし、RNA ポリメラーゼサブユニットの一部である RPA39 のように、一過的に NORs から離れるものも存在する (Leung et al., 2004)。一方、DFC や GC に局在していたタンパク質は perichoromosomal region

と呼ばれる染色体周辺部に局在するか、あるいは細胞質全体に拡散する (Gautier et al., 1992)。分裂終期になると、これらのタンパク質は prenucleolar bodies (PNBs) と呼ばれる構造を形成し、徐々に NORs にリクルートされて、G1 期になると娘細胞において元の核小体の構造が観察される (Angelier et al., 2005; Dundr et al., 2000; Hernandez-Verdun, 2011)。また、fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) や fluorescence loss in photobleaching (FLIP) による解析により、UBF、nucleolin、fibrillarin、B23 といったものに代表される核小体タンパク質は、核小体-核質間を行き来していることが明らかになっている (Chen and Huang, 2001; Phair and Misteli, 2000)。以上のことは、核小体が非常にダイナミックな構造体であることを示唆している。また他の核内構造体と同様、核小体もやはり膜を持たない構造体である。こうしたことから、核小体の構造は rDNA や rRNA、核小体タンパク質などの核小体構成因子の相互作用の結果できたものであることが示唆されている (Emmott and Hiscox, 2009)。

(1.4) 本研究の目的

核小体は数多くの研究者を魅了し、その結果機能に関する知見は多数得られてきた。一方、核内ドメインの一つとして構造形成のモデルは提唱されているものの、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。しかし核小体の構造は、核マトリクスを調製する操作、すなわち界面活性剤処理、高塩処理、DNase 処理という一連の操作の後にも、電子顕微鏡下で最も電子密度の高い領域として観察される (Wan et al., 1999)。このことは、核小体も他の核内ドメイン同様、構成因子間の相互作用のもとに成り立つ定常状態において見られる構造であるが、核小体にはその構造の基盤となる分子が存在し、それは核マトリクス画分に残存する分子であるということが推測される。そこで本研究では、「核マトリクス画分

に含まれる分子が核小体の構造的基盤として機能している」といった作業仮説を打ち立て、この仮説を証明するために特定の分子に着目し、核小体の構造との関連を詳細に調べることにより、核小体の、ひいては核内ドメインの構造に関する知見を得ることを目指す。

第2章：核小体構造タンパク質の核小体局在機構

(2.1): 導入

膜を持たない構造体である核内ドメインの構造は、定常状態におけるある種のスナップショットであることが示唆されている (Dundr and Misteli, 2001)。すなわち構成因子間の相互作用はダイナミックに行われているが、結果としてその構造がある形として存在している。核小体も例外ではなく、rDNA や rRNA、核小体タンパク質といった構成因子間の相互作用がその構造形成の大本であることが示唆されている (Emmott and Hiscox, 2009)。一方核マトリクス画分に含まれる核小体因子が核小体の構造の基盤として機能していることが推測される。しかし、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。

先行研究により、核マトリクスタンパク質として 333 種のタンパク質が同定され、そこには 39 種の新規タンパク質が含まれていた (Ishii et al., 2008)。同定された核マトリクスタンパク質群は、全タンパク質に比べ天然変性領域に富むという特徴を持っていた。天然変性領域は特定の三次構造をとらないアミノ酸領域であり、その特徴ゆえにより多くの分子と相互作用できることから、分子間相互作用のハブとして機能することが示唆されている (Dyson and Wright, 2005; Tompa, 2002)。このことから、核マトリクスタンパク質の中で核小体の構成因子であるものの天然変性領域が、その領域における他分子との相互作用を通し、核小体の構造形成に寄与していることが推測される。

そこで本章では、核マトリクスタンパク質として同定されたタンパク質の中から、新規タンパク質であり、かつ核小体に局在を示した WDR46、NOL10、WDSOF1、RRS1、GIYD1、MAK16、KIAA0409 (Ishii et al., 2008)、また核小体の構造タンパク質であることが示唆されている BXDC1 および EBP2 (Hirano et al., 2009)に着目し、それらの天然変性領域と核

小体局在機構との関連を調べることにより、核小体の構造形成に関する知見を得ることを目指した。

(2.2): 結果

(2.2.1) 着目した核マトリクスタンパク質の核小体局在機構

BXDC1、WDR46、NOL10、WDSOF1、EBP2、RRS1、GIYD1、MAK16 および KIAA0409 の欠失変異体を GFP 融合タンパク質の形で HeLa 細胞内にて発現させ、それらの局在を蛍光顕微鏡により観察した。核小体は、核小体タンパク質である nucleolin を免疫蛍光染色にてラベルすることで可視化した。以下にその詳細を記述する。なお、アミノ酸領域 x-y を a.a.x-y と略して表記する。また cNLS Mapper (Kosugi et al., 2009) によって予測された核移行シグナルの領域を図中において青で示した。

- BXDC1 (全長アミノ酸数 306)

欠失変異体 a.a.1-80 および a.a.81-306 を作製し、それらの局在を調べた。その結果、a.a.1-80 が核小体に局在した。a.a.81-306 は核小体にはわずかなシグナルしか見られず、大部分は核質に局在した (図 3)。

- WDR46 (全長アミノ酸数 610)

欠失変異体 a.a.1-146、a.a.147-535 および a.a.536-610 を作製し、それらの局在を調べた。その結果、a.a.1-146 および a.a.536-610 が核小体に局在した。a.a.147-535 は核小体にわずかながら強いシグナルが見られたものの、核質および細胞質にも局在した (図 4)。

- NOL10 (全長アミノ酸数 688)

欠失変異体 a.a.1-81、a.a.82-387 および a.a.388-688 を作製し、それらの局在を調べた。その結果、a.a.388-688 が核小体に局在した。残り 2 種の欠失変異体は核小体にシグナルが見られなかった。a.a.1-81 は核質により強いシグナルが見られ、細胞質にもシグナルが確認された。a.a.82-387 は細胞質により強いシグナルが見られ、核質にもシグナルが確認された (図 5)。

- WDSOF1 (全長アミノ酸数 597)

欠失変異体 a.a.1-206、a.a.207-505 および a.a.506-597 を作製し、それらの局在を調べた。その結果、a.a.506-597 が核小体に局在した。残り 2 種の欠失変異体は核小体にシグナルが見られなかった。a.a.1-206 は核質により強いシグナルが見られ、細胞質にもシグナルが確認された。a.a.207-505 は細胞質により強いシグナルが見られ、核質にもシグナルが確認された (図 6)。

- EBP2 (全長アミノ酸数 306)

欠失変異体 a.a.1-60、a.a.61-306 および a.a.221-306 を作製し、それらの局在を調べた。その結果、a.a.61-306 および a.a.221-306 が核小体に局在した。a.a.1-60 は核質により強いシグナルが見られ、核小体および細胞質にもわずかにシグナルが確認された (図 7)。

- RRS1 (全長アミノ酸数 365)

欠失変異体 a.a.1-200 および a.a.201-365 を作製し、それらの局在を調べた。その結果、a.a.1-200 が核小体に局在した。a.a.201-365 は核質および核小体に同程度のシグナルが

確認された (図 8)。

- GIYD1 (全長アミノ酸数 275)

欠失変異体 a.a.1-120 および a.a.121-275 を作製し、それらの局在を調べた。その結果、a.a.121-275 が核小体に局在した。a.a.1-120 は核小体にわずかに強いシグナルが確認されたものの、核質および細胞質にもシグナルが確認された (図 9)。

- MAK16 (全長アミノ酸数 300)

欠失変異体 a.a.1-122 および a.a.123-300 を作製し、それらの局在を調べた。その結果、a.a.1-122 は核質および核小体にシグナルが見られ、細胞質にもわずかにシグナルが確認された。a.a.123-300 は核質にシグナルが確認された (図 10)。

- KIAA0409 (全長アミノ酸数 456)

欠失変異体 a.a.1-231 および a.a.232-456 を作製し、それらの局在を調べた。その結果、a.a.1-231 は細胞質、核質および核小体にシグナルが確認され、a.a.232-456 は核質および核小体にシグナルが確認された (図 11)。

(2.2.2) 核小体局在機構と天然変性領域の関連性

次にこれらのタンパク質の核小体局在機構と天然変性領域との関連をより詳細に調べることを試みた。6 つの天然変性領域予測プログラム (DisEMBL (Linding et al., 2003)、DISOPRED2 (Ward et al., 2004)、IUPred (Dosztányi et al., 2005a; Dosztányi et al., 2005b)、PONDR-FIT (Xue et al., 2010)、POODLE (Hirose et al., 2010)、FoldUnfold (Galzitskaya et al., 2006)) を用い、それぞれ天然変性領域であると予測された領域を図 12

において青色で示した。6つの予測プログラムすべてにおいて天然変性領域であると予測された領域をここでは consensus の天然変性領域とし、図 12 においては緑色で示した。また、実際に核小体局在を示した領域を赤色で示し、それらと天然変性領域とを比較した (図 12)。MAK16 および KIAA0409 に関しては顕著な核小体局在を示したのは全長のみであったものの、核小体局在を示した領域に consensus の天然変性領域が含まれていたタンパク質は、WDR46、NOL10、WDSOF1、EBP2、RRS1、MAK16 および KIAA0409 の 7 種であった (図 12)。しかし BXDC1 および GIYD1 に関しても、核小体局在を示した領域は consensus には至らなかったものの、多くの予測プログラムから天然変性領域と予測されており傾向としては天然変性領域を含んでいた。以上のことから、核小体に局在するこれら新規核マトリクスタンパク質の核小体局在には天然変性領域が重要な役割を果たしていることが示唆された。

(2.3): 考察

本章では、核小体の構造に関する疑問に対し、核小体局在性の核マトリクスタンパク質の核小体局在機構とその天然変性領域との関係を明らかにするという観点から切り込んだ。以下において、一般的な核小体局在化のメカニズムおよび着目したタンパク質における天然変性領域の役割について熟考したい。

(2.3.1) 核小体局在機構

核小体局在性のタンパク質の核小体局在機構に関する研究はこれまでに多数なされており、数多くの核小体局在シグナル (nucleolar localization signal: NoLS) の存在が報告され

ている (Ahn et al., 2007; Guo et al., 2009; Kalt et al., 2012; Kumari et al., 2007; Lechertier et al., 2007; Melén et al., 2007)。しかしこれら NoLS は、リジンやアルギニンといった塩基性残基に富むという傾向は見られるものの、コンセンサスの配列はないようである。このことは、NoLS が何らかの輸送因子に認識されるシグナル配列ではないことを示唆している。核小体に存在する”ハブ”との相互作用が、核小体局在に必要であることが示唆される。実験的に検証された NoLS の多くがタンパク質の表面に位置しており、他の分子と容易に相互作用できるようになっている (Scott et al., 2010)。核小体が膜を持たない構造体であること、また同定された NoLS にコンセンサスの配列がないことを考えると、核小体局在には膜を通過するカリオフィリン依存性の核移行システムのように、シグナル配列による移行システムは必要ないと考えるのが妥当である。

着目した 9 種のタンパク質のうち 7 種が、核小体局在を示した欠失変異体に consensus の天然変性領域が含まれており (図 12)、核小体タンパク質の核小体局在には天然変性領域が重要な役割を果たしていることが示唆された。天然変性領域は分子間相互作用のハブであり、すなわち他の分子と相互作用する領域である (Dyson and Wright, 2005; Tompa, 2002)。核小体局在を示した一連の GFP 融合欠失変異体も、その天然変性領域を介して核小体内の何らかの分子と相互作用し、それが結果として核小体局在を示したと考えられる。この結果は、核小体局在が構成因子間の相互作用によるものであることをより強固にし、加えて、その相互作用には天然変性領域の存在が一つの鍵になることを示唆するものであると考えられる。

(2.3.2) 核マトリクスタンパク質における天然変性領域が核小体構造に及ぼす影響

着目した核小体タンパク質は核マトリクスタンパク質として同定されてきたものであり、これらが核小体の構造的基盤として機能するという仮説を打ち立て、この仮説のもとに本

章を進めてきた。その結果、核小体局在性の核マトリクスタンパク質の天然変性領域が核小体の構造に影響を与えていることが示唆された。これにより、個々のタンパク質レベルの大きさを俯瞰すると核マトリクスタンパク質が核小体の構造的基盤となっており、もう少し小さな領域を眺めてみると、その天然変性領域が柔軟に構造を変化させ、数多くの分子と相互作用することにより核小体という構造を支えているといった仮説が考えられる。次章では、この仮説をより詳細に検証したい。

第 3 章 : WDR46 の核小体内組織化への関与

(3.1): 導入

前章により、核小体に局在する核マトリクスタンパク質の核小体局在には天然変性領域が重要な役割を果たしていることが示唆された。天然変性領域は分子間相互作用のハブとして機能する領域であり、また核小体の構造は構成因子間の相互作用の上に成り立っていることが示唆されている。これらを総合的に考えると、核マトリクスタンパク質がその天然変性領域の機能により核小体の構造的基盤として存在していることが示唆される。そこで、着目した核小体局在性の核マトリクスタンパク質から、新規タンパク質として同定されたものであり、かつその核小体局在機構と天然変性領域との関連性が顕著に高かった WDR46 に焦点を当てた。WDR46 はドメイン構造として WD 40 リピートドメインおよび BING4CT ドメインを含む (図 13 A)。WD 40 リピートドメインは β プロペラ構造を形成し、天然変性領域と同様に分子間相互作用のハブとして機能することが示唆されている (Chang et al., 2001; Garcia-Higuera et al., 1996)。BING4CT ドメインの機能については明らかになっていない。免疫蛍光染色法により、内在性の WDR46 が核小体に局在することを確認した (図 13 B)。本章では WDR46 の構造的アプローチを主とした解析を行うことで、核小体構造の構造形成機構に切り込む。

(3.2): 結果

(3.2.1) WDR46 の結合タンパク質の同定

FLAG タグを付加した WDR46 (FLAG-WDR46)を HeLa 細胞で発現させ、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降法により FLAG-WDR46 とその複合体を単離し、LC-MS/MS 解析により WDR46 の結合タンパク質を同定することを試みた (図 14)。なお LC-MS/MS の解析は京都大学大学院生命科学研究科、渡邊祐三氏に依頼した。WDR46 の結合タンパク質の候補として挙がってきたものの中から、特に emPAI 値 (Ishihama et al., 2005)が高く、核小体に局在する、nucleolin、DDX21、NOP2、EBP2 および fibrillarin の 5 つのタンパク質を、WDR46 の主要な結合タンパク質として採り上げた (Henning et al., 2003; Hirano et al., 2009; Ishihama et al., 2005; Uchiyama et al., 1997) (表 1)。

これらのタンパク質は過剰発現させた FLAG-WDR46 の結合タンパク質として同定されたものである。そこで、まずは内在性の WDR46 が実際に上記 5 つのタンパク質に結合するかを調べるために、抗 WDR46 抗体を用いた免疫沈降実験を行った。その結果、nucleolin、DDX21、NOP2、GFP-EBP2 および fibrillarin はそれぞれ免疫沈降された複合体に含まれていることが、ウェスタンブロッティングによる解析により明らかになった (図 15)。なお、核小体の FC に局在する 2-30 抗原 (Hirano et al., 2008)は免疫沈降された WDR46 の複合体には含まれておらず、上記免疫沈降実験のネガティブコントロールである。以上の結果より、採り上げた 5 つのタンパク質の WDR46 との結合は過剰発現による影響ではなく、実際に WDR46 は細胞内において nucleolin、DDX21、NOP2、EBP2 および fibrillarin と相互作用していることが明らかになった。

(3.2.2) WDR46 複合体における RNA の関与

核小体には RNA が豊富に存在し、WDR46 の複合体にも RNA の何らかの関与があることが推測される。興味深いことに、以下に示す実験から WDR46 とその結合パートナーとの相互作用はタンパク質—タンパク質間の直接の相互作用であり、RNA が何らかの形でこ

これらの相互作用を制御していることが示唆された。抗 WDR46 抗体を用いた免疫沈降中に RNase A を作用させたところ、共沈降してきた DDX21、NOP2、EBP2 および fibrillarin の量は RNase A を作用させないときと比べ増加した。一方、共沈降してきた nucleolin の量は変化しなかった (図 16 A)。また、免疫沈降によって得られた WDR46 の複合体から RNA を精製し、それに対して定量 PCR による解析を行ったところ、そこに含まれる 18S rRNA の量は GAPDH の mRNA および 28S rRNA の量に比べて多い傾向にあった (図 16 B-C)。現時点では RNA が WDR46 とその結合タンパク質との相互作用にどのように関与しているかは不明であるが、RNA は WDR46 と DDX21、NOP2、EBP2 および fibrillarin との相互作用を負に制御し、WDR46 がこれら核小体タンパク質の RNA 非結合型の基盤として機能していることが示唆された。

(3.2.3) 天然変性領域の持つ分子間相互作用のハブとしての機能

次に、WDR46 と上記 5 つのタンパク質との相互作用が WDR46 のどの領域で起こっているかを調べた。WDR46 の a.a.1-146 (N-terminal (NT): 天然変性領域を含む)、a.a.147-535 (WD repeat domain containing (WD): WD 40 ドメインを含む)、および a.a.536-641 (C-terminal (CT): 天然変性領域を含む)の GST 融合欠失変異体が大腸菌で発現・精製し、それらと HeLa 細胞可溶化液を用いたプルダウンアッセイを行った (図 17 A-B)。その結果、nucleolin、DDX21、EBP2 および fibrillarin に関しては、WDR46 の N 末端領域と C 末端領域に同程度の量比で結合していることが明らかになった。一方、NOP2 に関しては、主に WDR46 の C 末端領域に結合していることが明らかになった (図 17 C)。WDR46 の N 末端領域および C 末端領域は天然変性領域であるため、以上の結果は、天然変性領域が分子間相互作用のハブとして機能するという考えを強く支持するものと考えている。さらに、WDR46 と NOP2 との相互作用は、WDR46 と nucleolin、DDX21、EBP2 および fibrillarin

との相互作用とは異なるメカニズムによるものであることが示唆された。

(3.2.4) WDR46 は核小体のスキャフォールドタンパク質である。

核マトリクスは、細胞に対し界面活性剤処理、高塩バッファー処理、DNase I 処理を段階的に行った後に残存する構造体であるが、この構造体はそれに引き続く RNase A 処理により大部分が崩壊してしまう (Fey et al., 1986)。上記の段階的処理に対する WDR46 の耐性を調べるため、界面活性剤処理、高塩バッファー処理、DNase I 処理および RNase A 処理それぞれの処理後の遠心上清画分、および残存画分を回収し、ウェスタンブロット法による解析を行った (図 18 A-B)。その結果、WDR46 は核マトリクスタンパク質としてよく知られている lamin B1 (Ludérus et al., 1992)と同様に、不溶性画分に残ることが明らかになった (図 18 B)。WDR46 の結合タンパク質は以下に記すように様々な溶解度を示した。まず nucleolin は高塩バッファー処理により溶出した。DDX21 と NOP2 は DNase I 処理後に溶出した。ただし、NOP2 に関しては不溶性画分に残るものも確認された。EBP2 は高塩バッファー処理および DNase I 処理両方の後に溶出した。Fibrillarin は主に高塩バッファー処理後に溶出された。以上のような段階的処理をカバーガラス上で培養した HeLa 細胞に対しても同様に行い、それぞれのタンパク質のシグナルを免疫蛍光染色法により検出したところ、WDR46 はやはり RNase A 処理後も溶出されず、ウェスタンブロッティングの結果と一致した (図 18 C)。Nucleolin、DDX21、NOP2、EBP2 および fibrillarin についても、ウェスタンブロッティングと同様の溶解度を示した。ただし NOP2 と EBP2 に関しては、RNase A 処理により溶出する結果となった。ウェスタンブロッティングの結果と免疫蛍光染色の結果には若干の差異が見受けられたものの、WDR46 およびその結合タンパク質の段階的処理による溶出の度合いはほぼ同じであった。

次に RNA が核小体局在に与える影響をより詳細に調べるため、RNase A 処理を DNase I

処理の後ではなく、界面活性剤処理の直後に行った。その結果、nucleolin は RNase A 処理により溶出した。DDX21、NOP2、EBP2 および fibrillarin は RNase A 処理では溶出せず、高塩バッファーにより溶出した。ただし fibrillarin に関しては、わずかに不溶性画分に残るものも見られた。それに対し、WDR46 に関してはその大部分が lamin B1 と同様に不溶性画分に残存した (図 19 A-B)。カバーガラス上では、RNase A 処理により DDX21 と NOP2 はその局在が変化し、EBP2 は溶出した (図 19 C)。この結果は、これらのタンパク質が核小体にとどまるために、RNA が中心的な役割を果たしていることを示唆している。WDR46 は lamin B1 と同様に不溶性画分に残存した (図 19 C)。これらの結果は、WDR46 は DNA および RNA 非依存的に核小体構造を支える、新規のスキヤフォールドタンパク質であることを示すものと考えている。

(3.2.5) WDR46 は Nucleolin および DDX21 の核小体局在の基盤として機能する。

WDR46 がその結合タンパク質の核小体局在に与える影響を調べるため、WDR46 をノックダウンした際の nucleolin、DDX21、NOP2、EBP2 および fibrillarin の細胞内局在を免疫蛍光染色法により観察した。siRNA により WDR46 のタンパク質量が 6 割減少したとき (図 20 A)、nucleolin および DDX21 は GC ではなく核小体の縁に局在した (図 20 B 矢印)。それに対し、WDR46 のノックダウンによる NOP2 および EBP2 の局在変化は観察されなかった (図 20 B)。すなわち、NOP2 および EBP2 の GC 局在は WDR46 非依存的であるのに対し、nucleolin および DDX21 の GC 局在は WDR46 依存的であることが明らかになった。もう一つの結合タンパク質である fibrillarin の局在は、WDR46 ノックダウン条件下でも影響を受けず、通常の DFC 局在を示した。GC マーカートンパク質である B23、および FC タンパク質である 2-30C 抗原の局在も WDR46 のノックダウンによって変化しなかった (図 20 B)。これらの結果により、WDR46 が GC の構造維持に寄与していることが示唆され

た。

WDR46 が GC 構造維持の役割を果たしていることを強固なものにするため、まずは WDR46 の分裂期における挙動を追跡した。分裂期初期（分裂前中期、中期および後期）の間は、WDR46 は rDNA 遺伝子や FC タンパク質が集積する NORs には局在せず、DFC タンパク質や GC タンパク質が示すような、染色体周辺の局在を示した（図 21）。分裂終期になると、DFC マーカータンパク質である fibrillarin はドット状の構造を形成しながら新生の核小体を集積していったのに対し、WDR46 および nucleolin は染色体周辺の局在を示したままであった（図 22-23）。初期 G1 期になると、WDR46 は nucleolin とほぼ同時に新生の核小体を集積していった（図 23）。次に、間期において WDR46 ノックダウンによりその局在を核小体の縁に変化させた nucleolin および DDX21 に関し、WDR46 ノックダウン条件下における分裂期の挙動を観察した。分裂終期までは nucleolin および DDX21 とともに WDR46 ノックダウンによる影響は見られなかった（図 24）。しかし、WDR46 ノックダウン条件下においては、nucleolin と DDX21 は初期 G1 期になっても PNB を形成しており、新生の核小体に正常に集積していかず（図 24 矢頭）、G1 期になってようやく核小体を集積していった。コントロールの細胞では、nucleolin と DDX21 は GC に均一に分配されたのに対し、WDR46 をノックダウンした細胞では、図で見られたように核小体の縁に局在した。一方、fibrillarin が分裂期を経て新生の核小体にリクルートされていく様子に関しては、分裂期全般を通し WDR46 のノックダウンによる影響は受けなかった（図 25）。これらの結果により、nucleolin と DDX21 は WDR46 依存的に新生の核小体に正常にリクルートされていくという考えは、より信憑性のあるものとなった。加えて、WDR46 ノックダウン後に nucleolin と DDX21 が見せる核小体の縁への局在は、分裂期を経て引き起こされる可能性が示唆された。

(3.3): 考察

本章では核小体の構造形成機構を明らかにするために、核マトリクスタンパク質である WDR46 に焦点を当て、WDR46 の核小体構造に関する寄与を詳細に調べた。以下に WDR46 をノックダウンした際に見られた現象およびスキャフォールドとしての WDR46 の機能に関し熟考したい。

(3.3.1) GC の微細領域

高等真核生物においては、rDNA の転写は核小体で起こり、転写された rRNA は精巧なプロセッシング過程を経て 18S、5.8S および 28S rRNA と成熟していく (Mullineux and Lafontaine, 2012)。酵母において、small subunit (SSU) processome と呼ばれる、18S rRNA のプロセッシングおよびリボソーム 40S サブユニットのアセンブリーに関与する RNA-タンパク質複合体が同定されている (Bernstein et al., 2004; Dragon et al., 2002; Grandi et al., 2002)。WDR46 の酵母のホモログである Utp7 が SSU processome の構成因子として同定されている。また、WDR46 の線虫のホモログが 18S rRNA のプロセッシングに関与していることが報告されている (Leung et al., 2012)。こうした事実は、ヒトの WDR46 も同様に 18S rRNA のプロセッシングに関与していることを示唆するものである。本研究においても、WDR46 が 18S rRNA と相互作用していることを明らかにした (図 16 B)。

WDR46 をノックダウンすると、nucleolin と DDX21 は核小体の縁に局在を変化させた一方で、NOP2、EBP2 および B23 の局在は変化しなかった (図 20)。Nucleolin は rDNA の転写や pre-rRNA のプロセッシング等、リボソーム生合成の様々な過程に関与しているものの (Ginisty et al., 1998; Roger et al., 2002)、nucleolin と DDX21 は 18S rRNA のプロセッシングに関与しており (Henning et al., 2003; Kondo and Inouye, 1992; Yang et al.,

2003)、一方 NOP2、EBP2 および B23 は 28S rRNA のプロセシングに関与している (Hong et al., 1997; Savkur and Olson, 1998; Tsujii et al., 2000)。本研究により、この知見を構造的観点から拡張することができ、以下のモデルを提案する。すなわち、核小体における GC はさらに 2 つの領域に分けることができる。一方の領域には 18S rRNA のプロセシングに関与する因子が集積しており、他方の領域には恐らく 28S rRNA のプロセシングに関与する因子が集積している。前者を 18S-related particle、後者を 28S-related particle と命名する。WDR46 は核小体の中で、18S-related particle の正常な分布に関与している (図 26 A)。

(3.3.2) スキャフォールドタンパク質、WDR46

核マトリクスタンパク質はヒトの全タンパク質と比較して天然変性領域に富むという性質を持っていた (Ishii et al., 2008)。このことは天然変性領域が細胞核の構造に何らかの形で寄与していることを示唆している。核マトリクスタンパク質の一つであり核小体に局在する WDR46 は、その結合パートナーと自身の天然変性領域を介して相互作用していた (図 17)。WDR46 の結合タンパク質の中でも、nucleolin と DDX21 に関しては、その核小体局在および新生核小体への集積は WDR46 依存的であった (図 20, 24)。現時点では WDR46 と EBP2、NOP2 および fibrillarin との相互作用の意義は不明であるが、少なくとも nucleolin や DDX21 が集積していると推測される GC 内の微細領域にとっては、WDR46 は本質的基盤となる存在であり、その基盤としての機能は WDR46 の天然変性領域を介した相互作用のもとに成り立つものである。

Nucleolin および DDX21 は WDR46 ノックダウン条件下において同様の核小体の縁への局在変化を示した一方で (図 20)、nucleolin と DDX21 の段階的バッファー処理に対する挙動は異なるものであった。Nucleolin は RNase A 処理で溶出したのに対し、DDX21 は RNase A では溶出しなかった (図 19)。この差異は、nucleolin と DDX21 が異なるメカニズムで核

小体に局在していることを示している。すなわち **nucleolin** はより RNA 依存的に核小体局在している核小体因子であることが示唆される。

WDR46 の核小体局在は DNA にも RNA にも非依存的であった (図 18-19)。この結果は、WDR46 はその分子としてはスキャフォールドとしての性質を持っており、自身のもつ N 末端領域および C 末端領域の天然変性領域を介した他分子との相互作用を介し、核小体の構造的基盤として機能しているタンパク質であることを示唆している (図 26 B)。

第4章：結び

(4.1) 核小体構造構築機構

核内ドメインの一つである核小体は、レーザー顕微鏡法の発展によりダイナミックな構造体であることが明らかになった (Chen and Huang, 2001; Phair and Misteli, 2000)。またプロテオミクスによる解析により、約 4,500 種ものタンパク質が核小体タンパク質として同定された (Ahmad et al., 2009; Leung et al., 2006)。核小体の構造がこうした膨大な種類の構成因子間の相互作用の結果形成されていることは事実であろう。しかし、これまでそういった相互作用の詳細に重点を置いた研究は見受けられなかった。

本研究では、核マトリクスタンパク質として同定された WDR46 に着目し、核マトリクスタンパク質群に見受けられた特徴である天然変性領域に重点を置き、核小体構造に与える寄与を明らかにすることを試みた。その結果、その核小体局在が DNA にも RNA にも依存しない真に難溶性である WDR46 が、核小体の GC 内の微細領域において、その天然変性領域による相互作用により構造的な役割を果たしている、すなわちスキャフォールドとして機能しているというモデルが導かれた (図 26)。本研究では核小体の GC の微細領域におけるスキャフォールドの存在を示したが、今後核小体の他の領域におけるスキャフォールドの存在が提示されることが期待される。バイオインフォマティクスによる解析から、分子間相互作用のハブとなるタンパク質は天然変性領域の割合が高いことが明らかになっており (Dunker et al., 2005; Haynes et al., 2006)、構造形成の大本が分子間のダイナミックな相互作用である核小体および他の核内ドメインの構造に関する研究では、天然変性領域の存在が研究の進展をけん引していくこととなるであろう。

(4.2) 今後の展望

天然変性領域と核内ドメインの構造を結び付けている研究は多くは見受けられない。しかし、本研究により核内ドメイン、少なくとも核小体に関しては天然変性領域がその構造に大きな貢献をしていることが明らかになった。構造そのものに着目したものではないが、Cajal ボディーのスキヤフォールドタンパク質である coilin の RNA 結合能、またウイルス抑制の機能を持つ PML ボディーの構成タンパク質である PML II とウイルスタンパク質との結合能において天然変性領域の存在が着目されており (Leppard et al., 2009; Makarov et al., 2013)、今後核内ドメインと天然変性領域との関連に着目した研究の発展が期待される。また、天然変性領域は結合パートナーによってその立体構造を変化させる性質をもっているが、本研究では WDR46 自身のタンパク質の立体構造には触れることができなかった。NMR 等の構造生物学的手法を組み合わせ、天然変性領域を中心とした核内ドメインのダイナミックな構造構築機構の原子レベルでの解析も今後期待される研究である。

材料と方法

プラスミド DNA 構築

GFP-BXDC1 および GFP-EBP2 をコードするプラスミド DNA は文献(Hirano et al., 2009)に記載のものを、GFP-WDR46、GFP-WDSOF1、GFP-GIYD1 をコードするプラスミド DNA は文献 (Ishii et al., 2008)に記載のものを使用した。GFP-NOL10、GFP-RRS1、GFP-MAK16、GFP-KIAA0409 をコードするプラスミド DNA は新潟大学堀米研究室により作製されたものを使用した。BXDC1 の a.a.1-80 および a.a.81-306、EBP2 の a.a.1-60 および a.a.61-306 の GFP 融合欠失変異体をコードするプラスミド DNA は、GFP-BXDC1 および GFP-EBP2 から HindIII と EcoRI、あるいは EcoRI と BamHI で目的の DNA 断片を切り出し、pEGFP-C ベクターに挿入することにより作製した。その他の GFP 融合欠失変異体をコードするプラスミド DNA は、上記の DNA を鋳型とした PCR により増幅したのち pEGFP-C ベクターに挿入することにより作製した。なお、それぞれの欠失変異体作製のために用いたプライマーの配列は以下の通りである。

WDR46

a.a.1-146: forward 5'-GGAATTCATGGAGACAGCCCCC-3'

reverse 5'-GGAATTCAGCTTTGATACTTGTTT-3'

a.a.147-535: forward 5'-GGAATTCATGGCTCGTTCTGAGCTG-3'

reverse 5'-GGAATTCCTCCTTCTTTCCCTG-3'

a.a.536-610: forward 5'-GGAATTCATGCAGATAGAGAGGCTG-3'

reverse 5'-GGAATTCGCGCACAAATCTGTC-3'

NOL10

a.a.1-81: forward 5'-CCGCTCGAGATGCAGGTCTCCAGCCTC-3'

reverse 5'-GGAATTCCGTCATAACATCGAACCCG-3'

a.a.82-387: forward 5'-CCGCTCGAGATGACCTATCAATTATCC-3'

reverse 5'-GGAATTCCGGTGAGCCCTAAATTTTC-3'

a.a.388-688: forward 5'-CCGCTCGAGATGCACCTCATTGGATCT-3'

reverse 5'-GGAATTCCATGAAACGACCGTCCTCT-3'

WDSOF1

a.a.1-206: forward 5'-CCGCTCGAGATGCAGTGGCCGCCACCG-3'

reverse 5'-GGAATTCCAAATACTCGTTCCAGTTT-3'

a.a.207-505: forward 5'-CCGCTCGAGATGGCAAAACCATTTCCTT-3'

reverse 5'-GGAATTCTTTCCACAGGCGAATGTT-3'

a.a.506-597: forward 5'-CCGCTCGAGATGGCTAATGCTTCTGAA-3'

reverse 5'-GGAATTCCTTTTACAAC TGCCACTAC-3'

EBP2

a.a.221-306: forward 5'-GGAATTCATGGCACAGCGCAAGAAGGCA-3'

reverse 5'-CGGGATCCGTGTGTTCTGTTCTTCAT-3'

RRS1

a.a.1-200: forward 5'-CCGCTCGAGATGGAGGGCCAGAGCGTG-3'

reverse 5'-CGGGATCCCGCTGCATCTTGTGCGCGCG-3'

a.a.201-365: forward 5'-CCGCTCGAGATGCTGCCCAGCGCGGCC-3'

reverse 5'-CGGGATCCCGCTTCCTCCTCTTTCTCCTCC-3'

GIYD1

a.a.1-120: forward 5'-CCGCTCGAGATGGGTCCCGCGGGGGTC-3'

reverse 5'-GGAATTCCTGCGCGCAGCATGTGCGC-3'

a.a.121-275: forward 5'-CCGCTCGAGATGCCGCCCTGGGCTCGC-3'

reverse 5'-GGAATTCGGTCTCCAGCAGGTCTGT-3'

MAK16

a.a.1-122: forward 5'-CCGCTCGAGATGCAGTCGGATGATGTT-3'

reverse 5'-CGGGATCCCGTCGAATTAGGTATTGGGT-3'

a.a.123-300: forward 5'-CCGCTCGAGATGATTAGAAAACCTTACA-3'

reverse 5'-CGGGATCCCGCGTGGTTTTGGCTTTGGC-3'

KIAA0409

a.a.1-231: forward 5'-CCGCTCGAGATGTTTGAAGAGCCTGAG-3'

reverse 5'-CGGGATCCCGATGGCTGTCTGTCCTGGG-3'

a.a.232-456: forward 5'-CCGCTCGAGATGGAGGCTCGGGCAGGG-3'

reverse 5'-CGGGATCCCGCCTGCGCTTGTAGAGACA-3'

WDR46 の GST 融合欠失変異体をコードする DNA は、それぞれ pEGFP-C1 に挿入された DNA 断片を pGEX-5X に移し替えることで作製した。FLAG タグ付き WDR46 を哺乳類細胞で発現させる DNA を作製するため、まずは WDR46 の全長をコードする cDNA を PCR により増幅し、pGEX-5X ベクターに挿入した (pGEX-WDR46)。WDR46 の全長を含んだ DNA 断片を pGEX-WDR46 から pcDNA3.1(+)に移し替えた。FLAG タグをコードする DNA

断片を、pcDNA3.1(+)に挿入された WDR46 の上流に挿入することで作製した。なお GFP 融合タンパク質および FLAG 融合タンパク質の発現は CMV プロモーターにより、GST 融合タンパク質の発現は tac プロモーターにより制御されている。

抗体

本研究において使用した抗体は以下の通りである。抗 FLAG M2 抗体 (Sigma 社)、抗 WDR46 抗体 (Proteintech Group 社)、2-30C (モノクローナル抗体)、5-42A (モノクローナル抗体、抗 nucleolin 抗体)、抗 fibrillarin 抗体 (Cytoskeleton 社<免疫染色用>および Abcam 社<ウェスタンブロット用>)、抗 DDX21 抗体 (Proteintech Group 社)、抗 NOP2 抗体 (ABGENT 社)、抗 EBP2 抗体 (Santa Cruz 社)、抗 lamin B1 抗体 (Abcam 社)、抗 GFP 抗体 (MBL 社)。

細胞培養および細胞内分画処理

HeLa S3 細胞は、5% CO₂ の 37°C のインキュベータで、Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma 社)に 10%の FBS (fetal bovine serum ; Hyclone 社)を含む培地で、ディッシュ内で培養した。HeLa 細胞の細胞内分画は (Fey et al., 1986)に記載のものを改変した形で行った。ウェスタンブロットに関しては、まずは回収した細胞を CSK (cytoskeleton) buffer [10 mM PIPES-NaOH (pH 6.8), 100 mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.5% Triton X-100, 1 mM PMSF and 1:100 protease inhibitor cocktail (nacalai tesque 社)]に再懸濁し 4°C で 10 分間静置した。800 g で 5 分間遠心分離したのち、ペレットを high-salt buffer [10 mM PIPES-NaOH (pH 6.8), 0.25 M (NH₄)₂SO₄, 300 mM

sucrose, 3 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.5% Triton X-100, 1 mM PMSF and 1:100 protease inhibitor cocktail (nacalai tesque 社)]に再懸濁し 4°C で 10 分間静置した。8,000 g で 5 分間遠心分離したのち、ペレットを 20 U/ml の DNase I を含む digestion buffer [10 mM PIPES-NaOH (pH 6.8), 50 mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.5% Triton X-100, 1 mM PMSF and 1:100 protease inhibitor cocktail (nacalai tesque 社)]に再懸濁し、37°C で 30 分間静置した。DNase I による切断は、(NH₄)₂SO₄ を終濃度 2 M になるように加えることで停止させた。8,000 g で 5 分間遠心分離したのち、ペレットを 200 µg/ml の RNase A を含む digestion buffer に再懸濁し、室温で 1 時間静置した。8,000 g で 5 分間遠心分離したのち、ペレットを 5% の SDS に再懸濁し、これを不溶性画分とした。顕微鏡観察に関しては、カバーガラス上で培養した細胞を PBS で 2 洗浄したのち、CSK buffer で 10 分間処理した。それに続き、high salt buffer で 5 分間処理した。残存物を、20 U/ml の DNase I を含む digestion buffer で 30 分間処理した。DNase I による切断は、0.25 M の (NH₄)₂SO₄ を加えることにより停止させた。残存した試料を 200 µg/ml の RNase A で 1 時間処理した。代替法として、RNase A による処理を DNase I 処理後ではなく CSK buffer 処理後に行った。

siRNA による遺伝子発現制御

siRNA は Invitrogen 社より購入した。WDR46 に対する siRNA の配列は、5'-(UUGUCAAUGCGACAGAACUUCUGGA)-3' である。コントロールとして、luciferase に対する siRNA もまた同様に Invitrogen 社より購入した。siRNA は Lipofectamine 2000 (Invitrogen 社)により、添付のプロトコルに従って導入した。

免疫染色および顕微鏡観察

HeLa 細胞へのプラスミド DNA の導入は Effectene Transfection Reagent(QIAGEN 社)により、添付のプロトコルに従って行った。未処理の、遺伝子導入した、あるいは細胞内分画処理された HeLa 細胞を、PBS で 2 回洗浄後、4% paraformaldehyde で室温 15 分間処理することにより固定した。試料は 0.5% Triton X-100 を含む 5% の goat serum あるいは fetal bovine serum で 15 分間ブロッキング処理を行い、続けて一次抗体処理を行った。その後、tetramethylrhodamine-5-(and-6)-isothiocyanate (TRITC) 標識した anti-mouse IgG (Cappel Laboratories 社), fluorescein-5-isothiocyanate (FITC "Isomer I") 標識した anti-rabbit IgG (Cappel Laboratories 社) あるいは Alexa Fluor® 568 標識した anti-goat IgG (Molecular Probes) の二次抗体反応処理により、特異的シグナルを検出した。分裂期細胞の観察に関して、HeLa 細胞を (Dousset et al., 2000) に記載されている通り同調した。分裂期の細胞を機械的に dish から剥離したのち、間期の細胞を 132 nM の nocodazole で 4 時間処理した。分裂期に同調された細胞を回収し、培地で 3 回洗浄することで細胞周期停止からリリースした。その後、ポリリジンでコートしたカバーガラスに細胞を乗せ、paraformaldehyde で固定後、免疫染色を行った。顕微鏡観察に先立ち、試料を Bisbenzimidazole H33342 Fluorochrome Trihydrochloride (Hoechst 33342) (nacalai tesque 社) を含む封入剤(VECTASHIELD: Vector Laboratories 社)で封入した。顕微鏡観察に関しては、間期の細胞の観察は、×63 Plan-Apo objective lens N.A.=1.4. を使用した共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 5 PASCAL, Carl Zeiss 社) により行い、分裂期の細胞の観察は、×63 Plan-Apo objective lens N.A.=1.4. を使用した、Colibri (Carl Zeiss 社) を光源とする広視野顕微鏡 (Axio-vert 200: Carl Zeiss 社) により行った。

質量分析法を用いた WDR46 の結合タンパク質の同定

FLAG-WDR46 を発現させた HeLa 細胞を回収し、RIPA buffer [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 0.1% deoxycholate, 1% Triton X-100 and 1:100 protease inhibitor cocktail (nacalai tesque 社)]に再懸濁したのち、超音波処理を行った。その後、20,400 g で 10 分間遠心分離を行い、上清を回収した。抗 FLAG 抗体を Dynabeads Protein A (Veritas 社)に結合させるため、RIPA buffer 中で両者を 4°C で 6 時間攪拌処理した。抗体が結合したビーズを、回収した細胞上清に加え、4°C で一晩攪拌した。ビーズを回収し、RIPA buffer で 5 回洗浄したのち、SDS-PAGE によって分離し、Coomassie Brilliant Blue によりゲルを染色した。染色したゲルを脱染したのち、8 µg/ml の trypsin (Promega 社)を含んだ 50 mM NH₄HCO₃ 中で、37°C で一晩静置した。ゲル内消化の後、抽出されたペプチドを LTQ LC/MS/MS (Thermo Fisher Science 社)で解析した。イオンスペクトルの解析は、Mascot program (Matrix Science 社)を使い、IPI human protein database に対して行った。

共免疫沈降法

HeLa 細胞を回収し、RIPA buffer に再懸濁したのち、超音波処理を行った。その後、20,400 g で 10 分間遠心分離を行い、上清を回収した。抗 WDR46 抗体を Dynabeads Protein A (Veritas 社)に結合させるため、RIPA buffer 中で両者を 4°C で 6 時間攪拌処理した。抗体が結合したビーズを、回収した細胞上清に加え、4°C で一晩攪拌した。ビーズを回収し、RIPA buffer で 5 回洗浄したのち、SDS-PAGE によって分離した。目的タンパク質のシグナルは、特異的抗体を用いたウェスタンブロット法により検出した。ウェスタンブロット法は以下に示すように行った。PVDF 膜にタンパク質を転写後、5%スキムミルクによりブ

ロッキングを行った。その後 5%スキムミルクまたは Can Get Signal (TOYOBO 社)で希釈した 1 次抗体液を転写後の PVDF 膜上に乗せ 1 時間振盪した。1 次抗体液を TBS-T にて 3 回洗浄した後、5%スキムミルクまたは Can Get Signal (TOYOBO 社)で希釈した 2 次抗体液を 1 次抗体反応後の PVDF 膜に乗せ 1 時間振盪した。2 次抗体液を TBS-T にて 3 回洗浄した後、Chemi-Lumi One Super (nacalai tesque 社)により目的のシグナルを検出した。

逆転写および定量 PCR

免疫沈降によって得られた WDR46 の複合体に含まれる RNA は、Proteinase K および DNase I 処理後、フェノール/クロロホルム抽出により精製した。精製された RNA に対する逆転写および定量 PCR は、LightCycler 480 qPCR system (Roche 社)を用い、SuperScript® III Platinum® SYBR® Green One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen 社)の添付のプロトコルに従うことで行った。定量 PCR に用いたプライマーセットは以下の通りである。

18S rRNA: forward 5'-(GGAGAGGGAGCCTGAGAAAC)-3'

reverse 5'-(TCGGGAGTGGGTAATTTGC)-3'

28S rRNA: forward 5'-(TTACCCTACTGATGATGTGTTGTTG)-3'

reverse 5'-(CCTGCGGTTCTCTCGTA)-3'

GAPDH: forward 5'-(AGCCACATCGCTCAGACAC)-3'

reverse 5'-(GCCCAATACGACCAAATCC)-3'

ブルダウンアッセイ

GST タグの付いた WDR46 の欠失変異体が大腸菌(BL21)で発現させ、Glutathione Sepharose 4B (GE healthcare 社)に結合させた。HeLa 細胞を RIPA buffer 中で超音波処理し、遠心分離後の上清を、上記のタンパク質を結合させたビーズに加え、4°C で 2 時間攪拌処理した。ビーズを回収し、RIPA buffer で 4 回洗浄したのち、SDS-PAGE によって分離した。目的タンパク質のシグナルは、特異的抗体を用いたウェスタンブロット法により検出した。

参考文献

- Adolphs, K.W., S.M. Cheng, J.R. Paulson, and U.K. Laemmli. 1977. Isolation of a protein scaffold from mitotic HeLa cell chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 74:4937-4941.
- Ahmad, Y., F. Boisvert, P. Gregor, A. Cobley, and A. Lamond. 2009. NOPdb: Nucleolar Proteome Database--2008 update. *Nucleic Acids Res*. 37:D181-184.
- Ahn, H., S. Kim, and H. Nam. 2007. Nucleolar translocalization of GRA10 of *Toxoplasma gondii* transfectionally expressed in HeLa cells. *Korean J Parasitol*. 45:165-174.
- Angelier, N., M. Tramier, E. Louvet, M. Coppey-Moisand, T.M. Savino, J.R. De Mey, and D. Hernandez-Verdun. 2005. Tracking the interactions of rRNA processing proteins during nucleolar assembly in living cells. *Mol Biol Cell*. 16:2862-2871.
- Berezney, R., and D.S. Coffey. 1974. Identification of a nuclear protein matrix. *Biochem Biophys Res Commun*. 60:1410-1417.
- Bernstein, K.A., J.E. Gallagher, B.M. Mitchell, S. Granneman, and S.J. Baserga. 2004. The small-subunit processome is a ribosome assembly intermediate. *Eukaryot Cell*. 3:1619-1626.
- Boisvert, F., S. van Koningsbruggen, J. Navascués, and A. Lamond. 2007. The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8:574-585.
- Carmo-Fonseca, M., L. Mendes-Soares, and I. Campos. 2000. To be or not to be in the nucleolus. *Nat Cell Biol*. 2:E107-112.
- Chang, B.Y., M. Chiang, and C.A. Cartwright. 2001. The interaction of Src and RACK1 is enhanced by activation of protein kinase C and tyrosine phosphorylation of RACK1. *J Biol Chem*. 276:20346-20356.
- Chen, D., and S. Huang. 2001. Nucleolar components involved in ribosome biogenesis cycle between the nucleolus and nucleoplasm in interphase cells. *J Cell Biol*. 153:169-176.
- Cheutin, T., M.F. O'Donohue, A. Beorchia, M. Vandelaer, H. Kaplan, B. Deféver, D. Ploton, and M. Thiry. 2002. Three-dimensional organization of active rRNA genes within the nucleolus. *J Cell Sci*. 115:3297-3307.
- Derenzini, M., M. Thiry, and G. Goessens. 1990. Ultrastructural cytochemistry of the mammalian cell nucleolus. *J Histochem Cytochem*. 38:1237-1256.
- Dosztányi, Z., V. Csizmok, P. Tompa, and I. Simon. 2005a. IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics*. 21:3433-3434.
- Dosztányi, Z., V. Csizmók, P. Tompa, and I. Simon. 2005b. The pairwise energy content

- estimated from amino acid composition discriminates between folded and intrinsically unstructured proteins. *J Mol Biol.* 347:827-839.
- Dousset, T., C. Wang, C. Verheggen, D. Chen, D. Hernandez-Verdun, and S. Huang. 2000. Initiation of nucleolar assembly is independent of RNA polymerase I transcription. *Mol Biol Cell.* 11:2705-2717.
- Dragon, F., J.E. Gallagher, P.A. Compagnone-Post, B.M. Mitchell, K.A. Porwancher, K.A. Wehner, S. Wormsley, R.E. Settlege, J. Shabanowitz, Y. Osheim, A.L. Beyer, D.F. Hunt, and S.J. Baserga. 2002. A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature.* 417:967-970.
- Dundr, M., and T. Misteli. 2001. Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem J.* 356:297-310.
- Dundr, M., T. Misteli, and M.O. Olson. 2000. The dynamics of postmitotic reassembly of the nucleolus. *J Cell Biol.* 150:433-446.
- Dunker, A.K., M.S. Cortese, P. Romero, L.M. Iakoucheva, and V.N. Uversky. 2005. Flexible nets. The roles of intrinsic disorder in protein interaction networks. *FEBS J.* 272:5129-5148.
- Dyson, H., and P. Wright. 2005. Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:197-208.
- Emmott, E., and J. Hiscox. 2009. Nucleolar targeting: the hub of the matter. *EMBO Rep.* 10:231-238.
- Fey, E., G. Krochmalnic, and S. Penman. 1986. The nonchromatin substructures of the nucleus: the ribonucleoprotein (RNP)-containing and RNP-depleted matrices analyzed by sequential fractionation and resinless section electron microscopy. *J Cell Biol.* 102:1654-1665.
- Galzitskaya, O.V., S.O. Garbuzynskiy, and M.Y. Lobanov. 2006. FoldUnfold: web server for the prediction of disordered regions in protein chain. *Bioinformatics.* 22:2948-2949.
- Garcia-Higuera, I., J. Fenoglio, Y. Li, C. Lewis, M.P. Panchenko, O. Reiner, T.F. Smith, and E.J. Neer. 1996. Folding of proteins with WD-repeats: comparison of six members of the WD-repeat superfamily to the G protein beta subunit. *Biochemistry.* 35:13985-13994.
- Gautier, T., M. Robert-Nicoud, M.N. Guilly, and D. Hernandez-Verdun. 1992. Relocation of nucleolar proteins around chromosomes at mitosis. A study by confocal laser scanning microscopy. *J Cell Sci.* 102 (Pt 4):729-737.
- Ginisty, H., F. Amalric, and P. Bouvet. 1998. Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing. *EMBO J.* 17:1476-1486.
- Grandi, P., V. Rybin, J. Bassler, E. Petfalski, D. Strauss, M. Marzioch, T. Schäfer, B. Kuster,

- H. Tschochner, D. Tollervey, A.C. Gavin, and E. Hurt. 2002. 90S pre-ribosomes include the 35S pre-rRNA, the U3 snoRNP, and 40S subunit processing factors but predominantly lack 60S synthesis factors. *Mol Cell*. 10:105-115.
- Guo, H., Q. Ding, F. Lin, W. Pan, J. Lin, and A.C. Zheng. 2009. Characterization of the nuclear and nucleolar localization signals of bovine herpesvirus-1 infected cell protein 27. *Virus Res*. 145:312-320.
- Haynes, C., C.J. Oldfield, F. Ji, N. Klitgord, M.E. Cusick, P. Radivojac, V.N. Uversky, M. Vidal, and L.M. Iakoucheva. 2006. Intrinsic disorder is a common feature of hub proteins from four eukaryotic interactomes. *PLoS Comput Biol*. 2:e100.
- Henning, D., R.B. So, R. Jin, L.F. Lau, and B.C. Valdez. 2003. Silencing of RNA helicase II/Gua1p inhibits mammalian ribosomal RNA production. *J Biol Chem*. 278:52307-52314.
- Hernandez-Verdun, D. 2011. Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle. *Nucleus*. 2:189-194.
- Hirano, Y., K. Ishii, M. Kumeta, K. Furukawa, K. Takeyasu, and T. Horigome. 2009. Proteomic and targeted analytical identification of BXDC1 and EBNA1BP2 as dynamic scaffold proteins in the nucleolus. *Genes Cells*. 14:155-166.
- Hirano, Y., H. Takahashi, M. Kumeta, K. Hizume, Y. Hirai, S. Otsuka, S.H. Yoshimura, and K. Takeyasu. 2008. Nuclear architecture and chromatin dynamics revealed by atomic force microscopy in combination with biochemistry and cell biology. *Pflugers Arch*. 456:139-153.
- Hirose, S., K. Shimizu, and T. Noguchi. 2010. POODLE-I: Disordered Region Prediction by Integrating POODLE Series and Structural Information Predictors Based on a Workflow Approach. *In Silico Biol*. 10:185-191.
- Hiscox, J.A. 2007. RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus. *Nat Rev Microbiol*. 5:119-127.
- Hong, B., J.S. Brockenbrough, P. Wu, and J.P. Aris. 1997. Nop2p is required for pre-rRNA processing and 60S ribosome subunit synthesis in yeast. *Mol Cell Biol*. 17:378-388.
- Huang, S. 2002. Building an efficient factory: where is pre-rRNA synthesized in the nucleolus? *J Cell Biol*. 157:739-741.
- Ishihama, Y., Y. Oda, T. Tabata, T. Sato, T. Nagasu, J. Rappsilber, and M. Mann. 2005. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol Cell Proteomics*. 4:1265-1272.
- Ishii, K., Y. Hirano, N. Araki, T. Oda, M. Kumeta, K. Takeyasu, K. Furukawa, and T. Horigome. 2008. Nuclear matrix contains novel WD-repeat and

- disordered-region-rich proteins. *FEBS Lett.* 582:3515-3519.
- Kalt, I., A. Levy, T. Borodianskiy-Shteinberg, and R. Sarid. 2012. Nucleolar localization of GLTSCR2/PICT-1 is mediated by multiple unique nucleolar localization sequences. *PLoS One.* 7:e30825.
- Koberna, K., J. Malínský, A. Pliss, M. Masata, J. Vecerova, M. Fialová, J. Bednár, and I. Raska. 2002. Ribosomal genes in focus: new transcripts label the dense fibrillar components and form clusters indicative of "Christmas trees" in situ. *J Cell Biol.* 157:743-748.
- Kondo, K., and M. Inouye. 1992. Yeast NSR1 protein that has structural similarity to mammalian nucleolin is involved in pre-rRNA processing. *J Biol Chem.* 267:16252-16258.
- Kornberg, R.D. 1974. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science.* 184:868-871.
- Kosugi, S., M. Hasebe, M. Tomita, and H. Yanagawa. 2009. Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:10171-10176.
- Kumari, G., P. Singhal, M. Rao, and S. Mahalingam. 2007. Nuclear transport of Ras-associated tumor suppressor proteins: different transport receptor binding specificities for arginine-rich nuclear targeting signals. *J Mol Biol.* 367:1294-1311.
- Lechertier, T., V. Sirri, D. Hernandez-Verdun, and P. Roussel. 2007. A B23-interacting sequence as a tool to visualize protein interactions in a cellular context. *J Cell Sci.* 120:265-275.
- Leppard, K.N., E. Emmott, M.S. Cortese, and T. Rich. 2009. Adenovirus type 5 E4 Orf3 protein targets promyelocytic leukaemia (PML) protein nuclear domains for disruption via a sequence in PML isoform II that is predicted as a protein interaction site by bioinformatic analysis. *J Gen Virol.* 90:95-104.
- Leung, A., L. Trinkle-Mulcahy, Y. Lam, J. Andersen, M. Mann, and A. Lamond. 2006. NOPdb: Nucleolar Proteome Database. *Nucleic Acids Res.* 34:D218-220.
- Leung, A.K., D. Gerlich, G. Miller, C. Lyon, Y.W. Lam, D. Lleres, N. Daigle, J. Zomerdijs, J. Ellenberg, and A.I. Lamond. 2004. Quantitative kinetic analysis of nucleolar breakdown and reassembly during mitosis in live human cells. *J Cell Biol.* 166:787-800.
- Leung, C.K., H. Empinado, and K.P. Choe. 2012. Depletion of a nucleolar protein activates xenobiotic detoxification genes in *Caenorhabditis elegans* via Nrf /SKN-1 and p53/CEP-1. *Free Radic Biol Med.* 52:937-950.
- Linding, R., L.J. Jensen, F. Diella, P. Bork, T.J. Gibson, and R.B. Russell. 2003. Protein

- disorder prediction: implications for structural proteomics. *Structure*. 11:1453-1459.
- Lud rus, M.E., A. de Graaf, E. Mattia, J.L. den Blaauwen, M.A. Grande, L. de Jong, and R. van Driel. 1992. Binding of matrix attachment regions to lamin B1. *Cell*. 70:949-959.
- Makarov, V., D. Rakitina, A. Protopopova, I. Yaminsky, A. Arutiunian, A.J. Love, M. Talianky, and N. Kalinina. 2013. Plant coilin: structural characteristics and RNA-binding properties. *PLoS One*. 8:e53571.
- Mao, Y.S., B. Zhang, and D.L. Spector. 2011. Biogenesis and function of nuclear bodies. *Trends Genet.* 27:295-306.
- Matera, A.G. 1999. Nuclear bodies: multifaceted subdomains of the interchromatin space. *Trends Cell Biol.* 9:302-309.
- Mel n, K., L. Kinnunen, R. Fagerlund, N. Ikonen, K. Twu, R. Krug, and I. Julkunen. 2007. Nuclear and nucleolar targeting of influenza A virus NS1 protein: striking differences between different virus subtypes. *J Virol*. 81:5995-6006.
- Misteli, T. 2001. The concept of self-organization in cellular architecture. *J Cell Biol.* 155:181-185.
- Misteli, T. 2007. Beyond the sequence: cellular organization of genome function. *Cell*. 128:787-800.
- Mullineux, S.T., and D.L. Lafontaine. 2012. Mapping the cleavage sites on mammalian pre-rRNAs: where do we stand? *Biochimie*. 94:1521-1532.
- Oudet, P., M. Gross-Bellard, and P. Chambon. 1975. Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell*. 4:281-300.
- Paulson, J.R., and U.K. Laemmli. 1977. The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell*. 12:817-828.
- Pederson, T. 2000. Half a century of "the nuclear matrix". *Mol Biol Cell*. 11:799-805.
- Phair, R.D., and T. Misteli. 2000. High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature*. 404:604-609.
- Raska, I. 2003. Oldies but goldies: searching for Christmas trees within the nucleolar architecture. *Trends Cell Biol.* 13:517-525.
- Rattner, J.B., and B.A. Hamkalo. 1979. Nucleosome packing in interphase chromatin. *J Cell Biol.* 81:453-457.
- Roger, B., A. Moisand, F. Amalric, and P. Bouvet. 2002. Repression of RNA polymerase I transcription by nucleolin is independent of the RNA sequence that is transcribed. *J Biol Chem*. 277:10209-10219.
- Savkur, R.S., and M.O. Olson. 1998. Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA by protein B23 endoribonuclease. *Nucleic Acids Res.* 26:4508-4515.
- Scott, M.S., F.M. Boisvert, M.D. McDowall, A.I. Lamond, and G.J. Barton. 2010.

- Characterization and prediction of protein nucleolar localization sequences. *Nucleic Acids Res.* 38:7388-7399.
- Spector, D.L. 2003. The dynamics of chromosome organization and gene regulation. *Annu Rev Biochem.* 72:573-608.
- Thoma, F., T. Koller, and A. Klug. 1979. Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J Cell Biol.* 83:403-427.
- Tomba, P. 2002. Intrinsically unstructured proteins. *Trends Biochem Sci.* 27:527-533.
- Tsujii, R., K. Miyoshi, A. Tsuno, Y. Matsui, A. Toh-e, T. Miyakawa, and K. Mizuta. 2000. Ebp2p, yeast homologue of a human protein that interacts with Epstein-Barr virus nuclear antigen 1, is required for pre-rRNA processing and ribosomal subunit assembly. *Genes Cells.* 5:543-553.
- Uchiyama, B., Y. Saijo, N. Kumano, T. Abe, S. Fujimura, K. Ohkuda, M. Handa, K. Satoh, and T. Nukiwa. 1997. Expression of nucleolar protein p120 in human lung cancer: difference in histological types as a marker for proliferation. *Clin Cancer Res.* 3:1873-1877.
- Vogelstein, B., D.M. Pardoll, and D.S. Coffey. 1980. Supercoiled loops and eucaryotic DNA replicaton. *Cell.* 22:79-85.
- Wan, K.M., J.A. Nickerson, G. Krockmalnic, and S. Penman. 1999. The nuclear matrix prepared by amine modification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:933-938.
- Ward, J.J., J.S. Sodhi, L.J. McGuffin, B.F. Buxton, and D.T. Jones. 2004. Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life. *J Mol Biol.* 337:635-645.
- Xue, B., R.L. Dunbrack, R.W. Williams, A.K. Dunker, and V.N. Uversky. 2010. PONDR-FIT: a meta-predictor of intrinsically disordered amino acids. *Biochim Biophys Acta.* 1804:996-1010.
- Yang, H., J. Zhou, R.L. Ochs, D. Henning, R. Jin, and B.C. Valdez. 2003. Down-regulation of RNA helicase II/Gu results in the depletion of 18 and 28 S rRNAs in *Xenopus* oocyte. *J Biol Chem.* 278:38847-38859.
- Zhao, R., M.S. Bodnar, and D.L. Spector. 2009. Nuclear neighborhoods and gene expression. *Curr Opin Genet Dev.* 19:172-179.

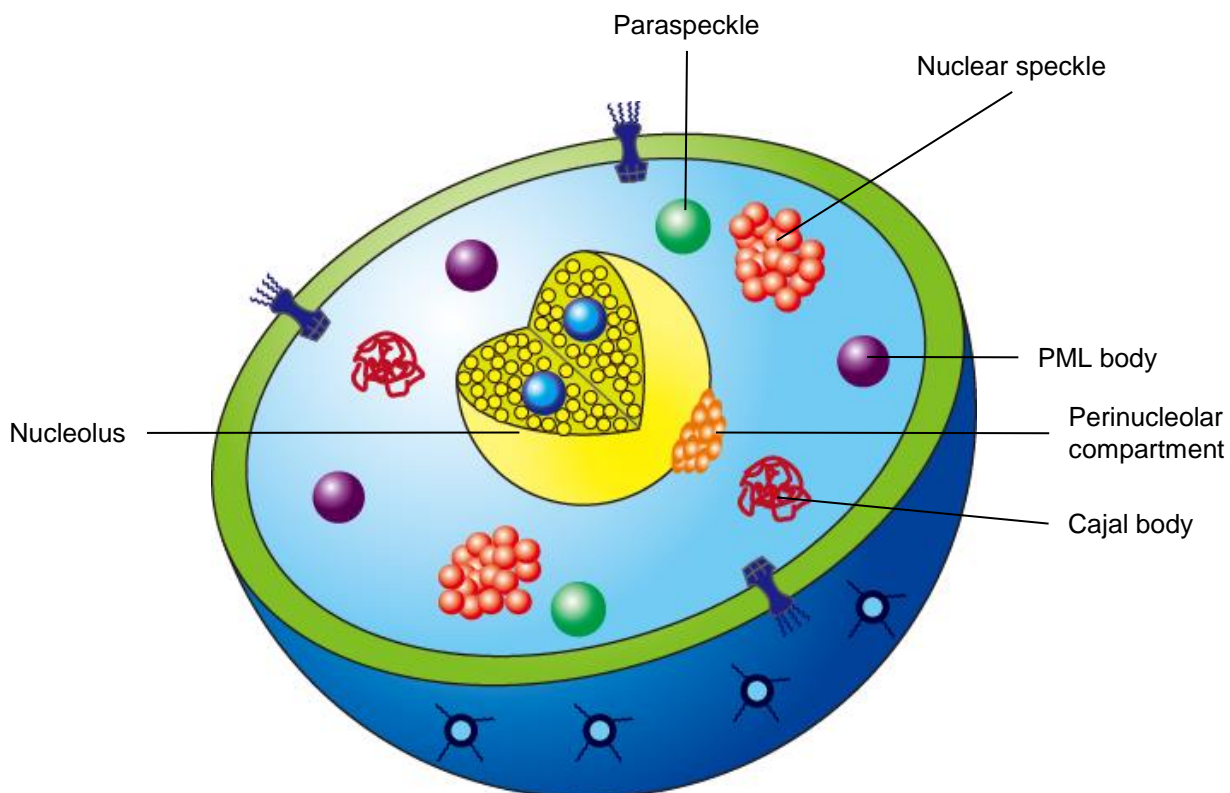
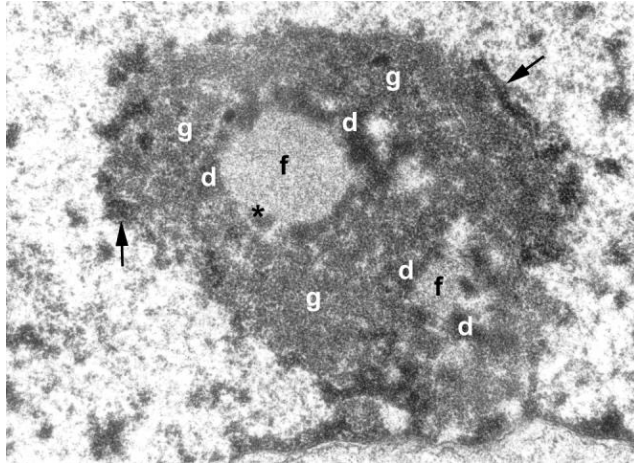


図1 細胞核内に存在する種々の核内ドメイン

細胞核内には大小さまざまな核内ドメインが存在する。それぞれが独自の機能を担っている。膜を持たないという共通点を持つ。

A



B

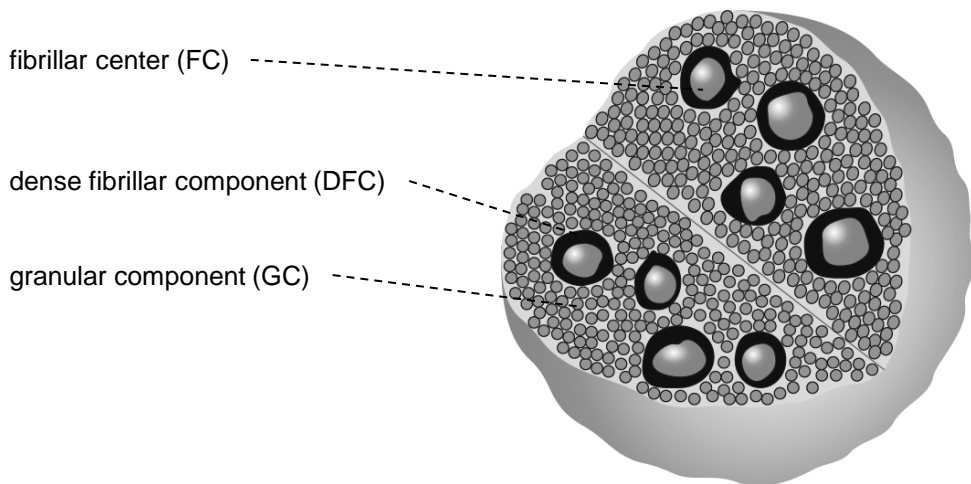


図2 核小体の内部構造

核小体の内部構造の(A) 電子顕微鏡写真 ((Raska, 2003)より引用した) および (B) その模式図。核小体はその中心部より fibrillar center (FC)、dense fibrillar component (DFC)、granular component (GC) の3つの領域に分けられる。

BXDC1

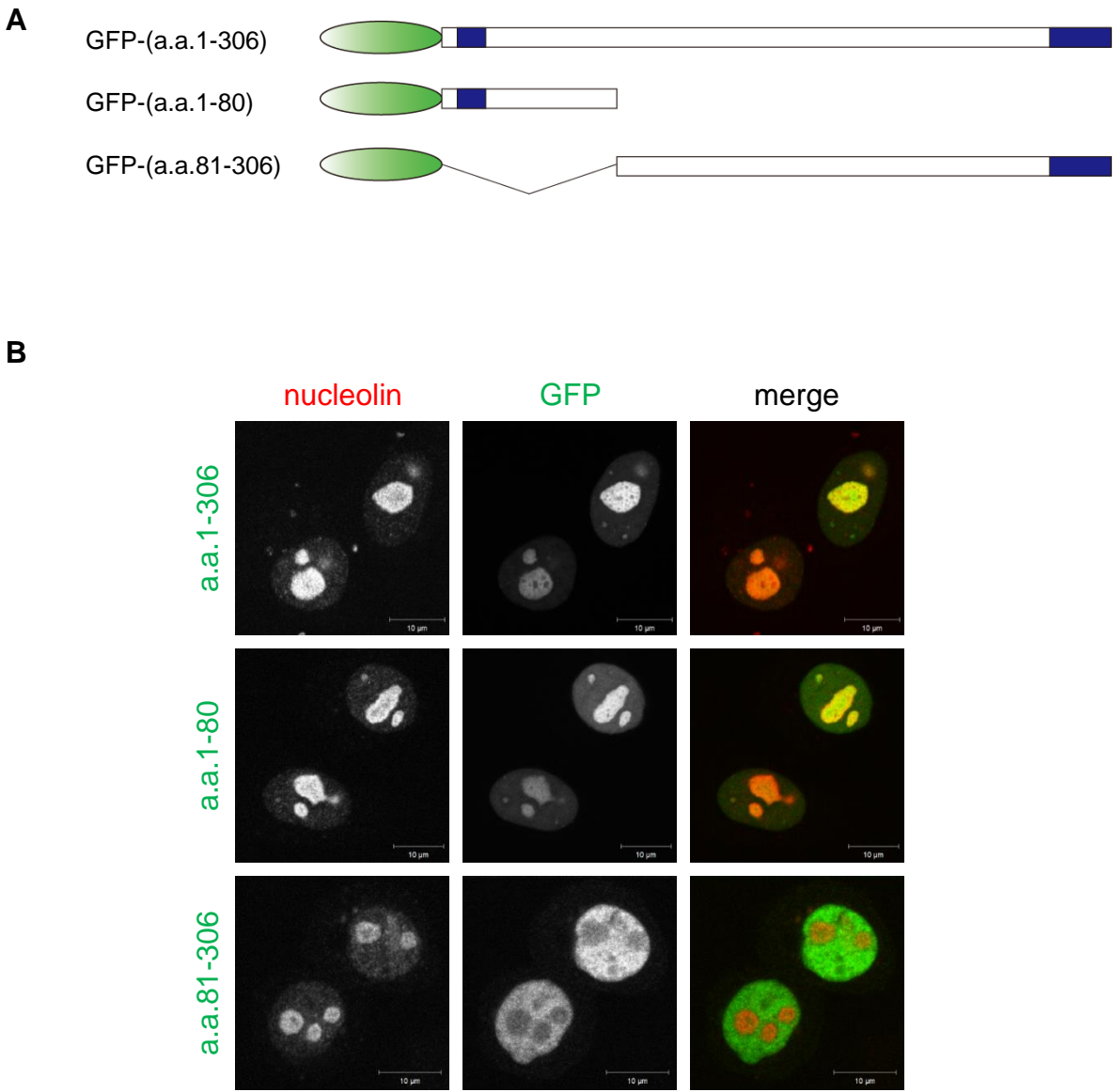


図3 BXDC1の核小体局在機構

(A) 作製したBXDC1のGFP融合欠失変異体の模式図。予測された核移行シグナルを青で示した。(B) それぞれの欠失変異体をHeLa細胞で発現させ、その局在を蛍光顕微鏡により観察した。それぞれ核小体タンパク質であるnucleolinの局在と比較した。スケールバーは10μmである。

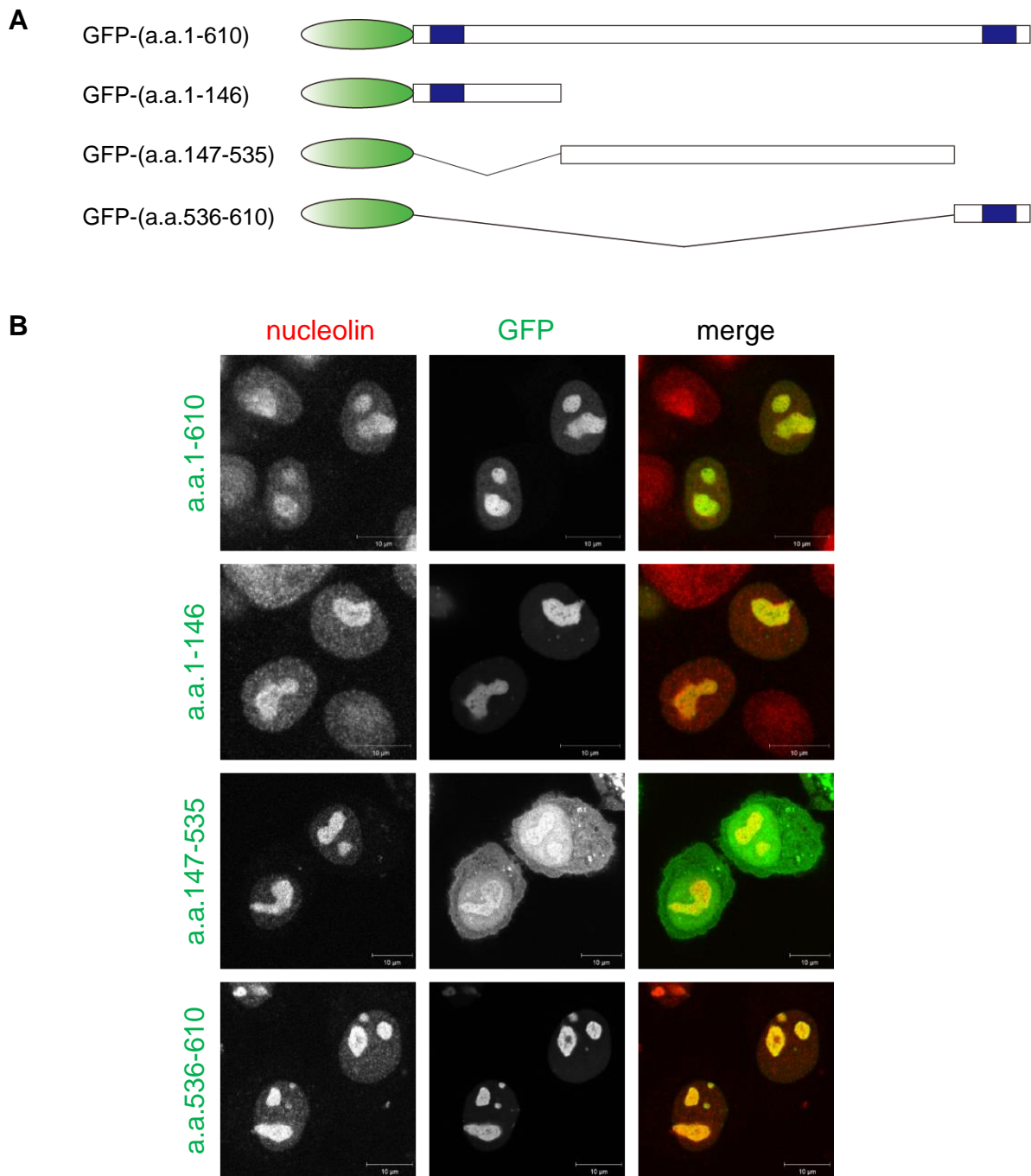


図4 WDR46の核小体局在機構

(A) 作製したWDR46のGFP融合欠失変異体の模式図。予測された核移行シグナルは青で示した。(B) それぞれの欠失変異体をHeLa細胞で発現させ、その局在を蛍光顕微鏡により観察した。それぞれ核小体タンパク質であるnucleolinの局在と比較した。スケールバーは10μmである。

NOL10

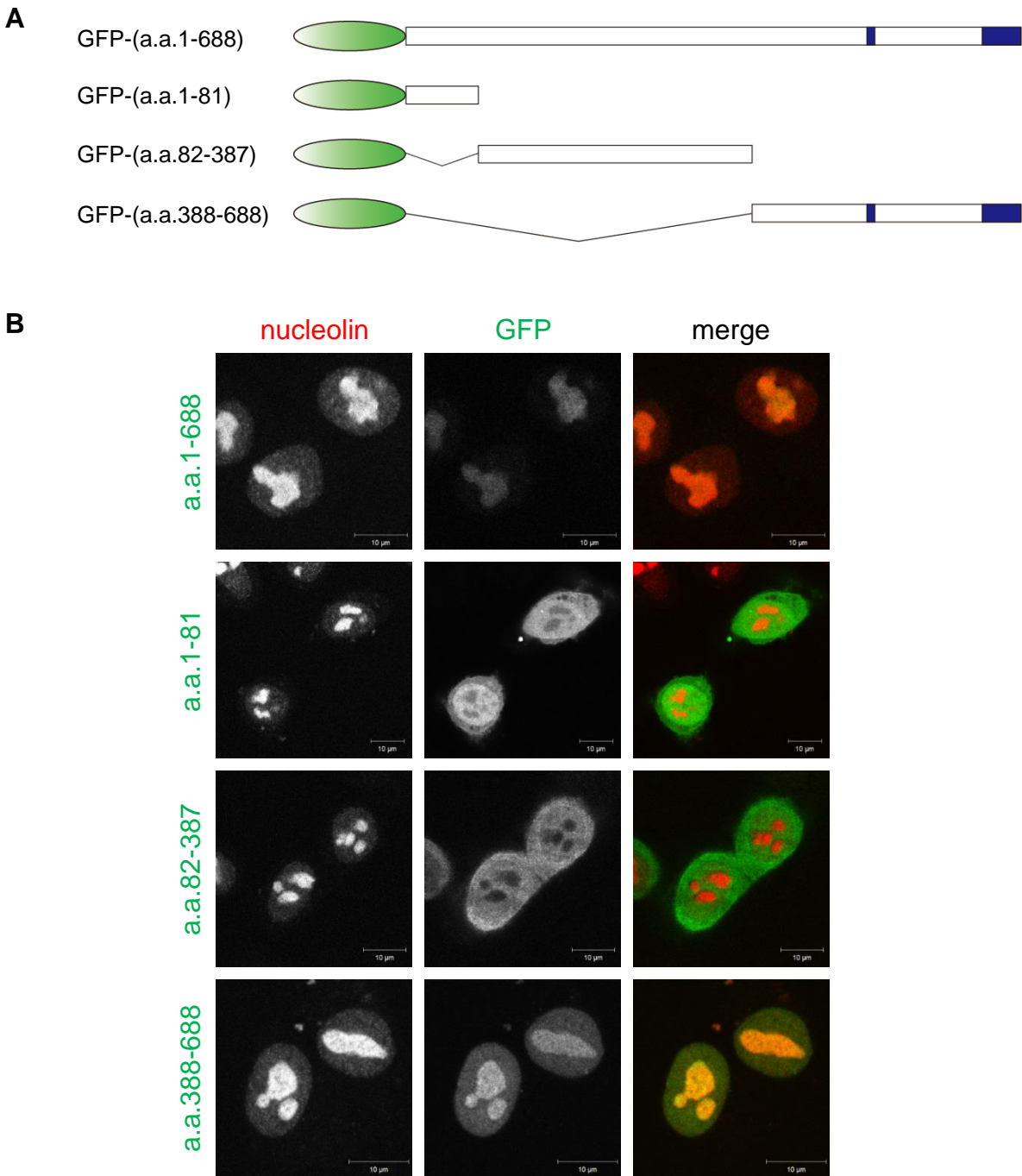


図5 NOL10の核小体局在機構

(A) 作製したNOL10のGFP融合欠失変異体の模式図。予測された核移行シグナルは青で示した。(B) それぞれの欠失変異体をHeLa細胞で発現させ、その局在を蛍光顕微鏡により観察した。それぞれ核小体タンパク質であるnucleolinの局在と比較した。スケールバーは10μmである。

WDSOF1

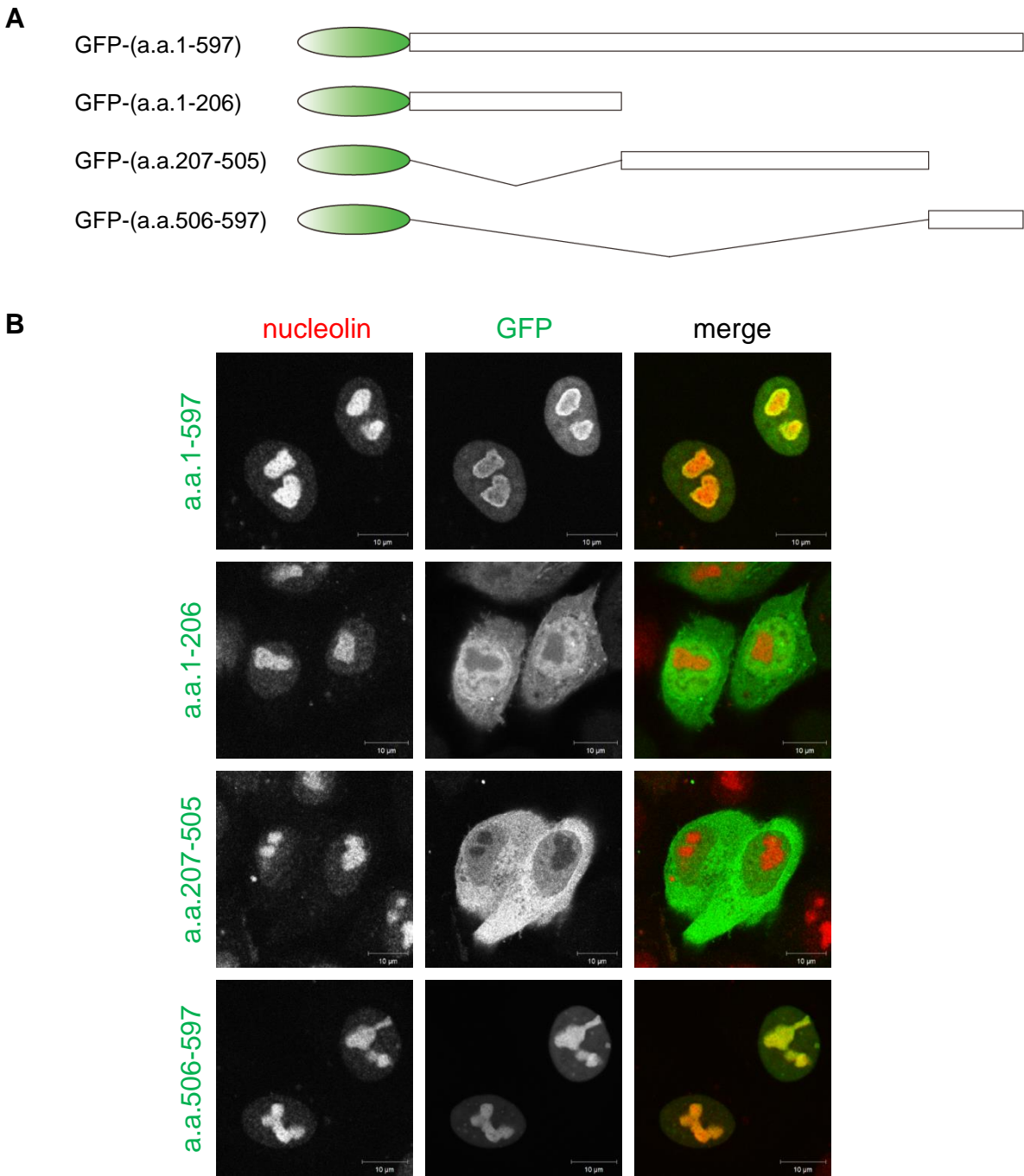


図6 WDSOF1の核小体局在機構

(A) 作製したWDSOF1のGFP融合欠失変異体の模式図。(B) それぞれの欠失変異体をHeLa細胞で発現させ、その局在を蛍光顕微鏡により観察した。それぞれ核小体タンパク質であるnucleolinの局在と比較した。スケールバーは10μmである。

EBP2

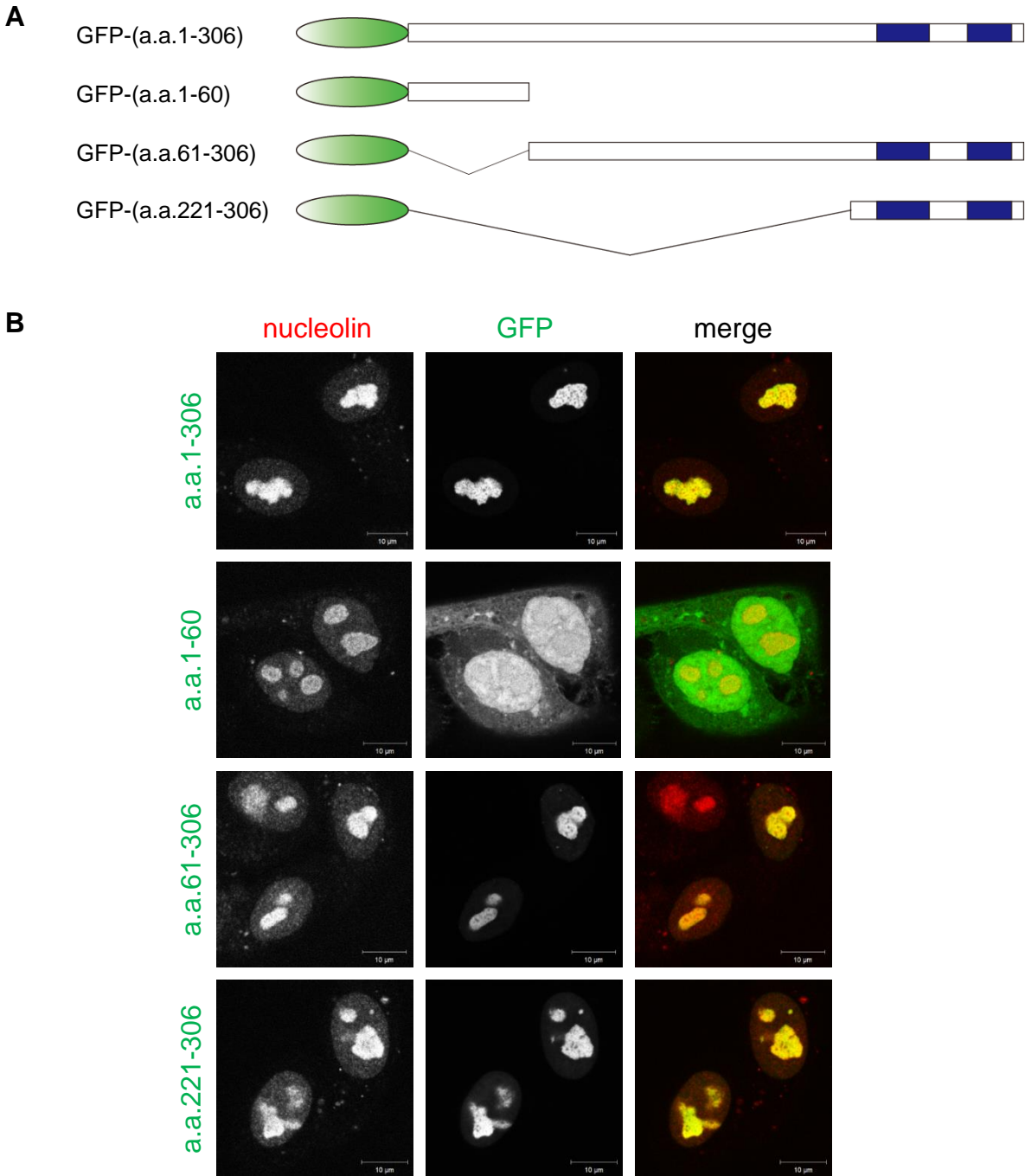


図7 EBP2の核小体局在機構

(A) 作製したEBP2のGFP融合欠失変異体の模式図。予測された核移行シグナルは青で示した。(B) それぞれの欠失変異体をHeLa細胞で発現させ、その局在を蛍光顕微鏡により観察した。それぞれ核小体タンパク質であるnucleolinの局在と比較した。スケールバーは10μmである。

RRS1

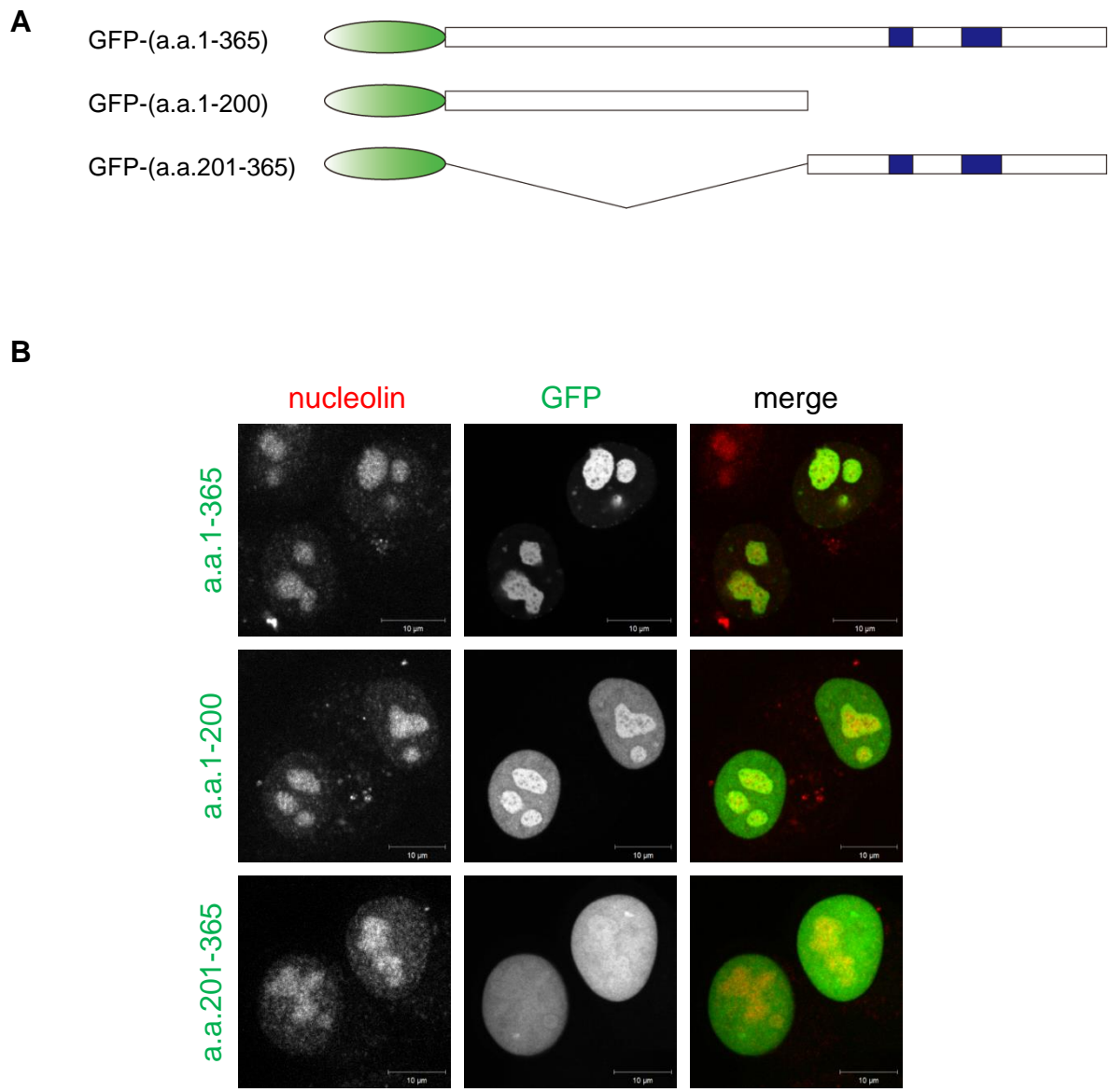


図8 RRS1の核小体局在機構

(A) 作製したRRS1のGFP融合欠失変異体の模式図。予測された核移行シグナルは青で示した。(B) それぞれの欠失変異体をHeLa細胞で発現させ、その局在を蛍光顕微鏡により観察した。それぞれ核小体タンパク質であるnucleolinの局在と比較した。スケールバーは10μmである。

GIYD1

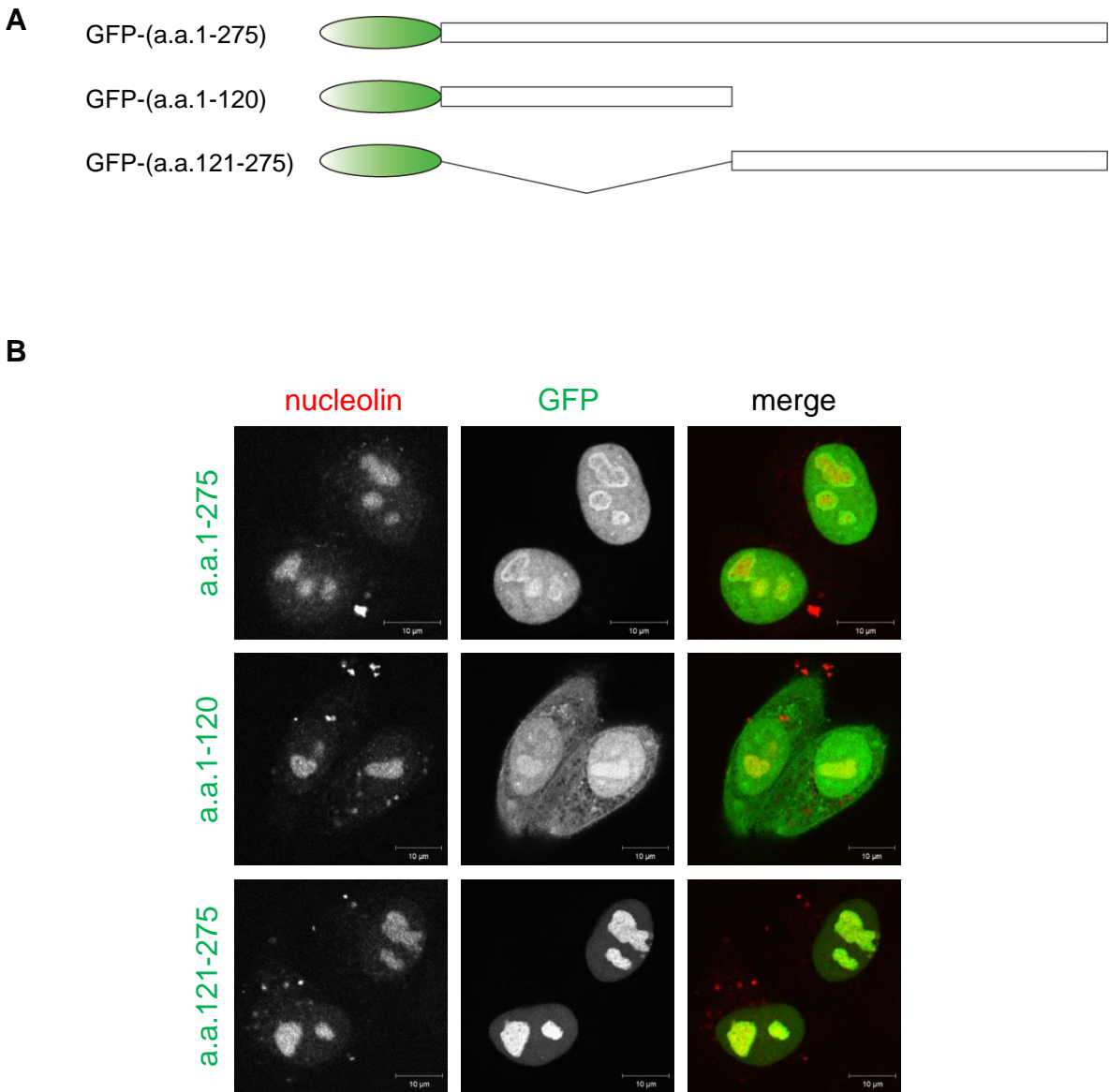


図9 GIYD1の核小体局在機構

(A) 作製したGIYD1のGFP融合欠失変異体の模式図。(B) それぞれの欠失変異体をHeLa細胞で発現させ、その局在を蛍光顕微鏡により観察した。それぞれ核小体タンパク質であるnucleolinの局在と比較した。スケールバーは10μmである。

MAK16

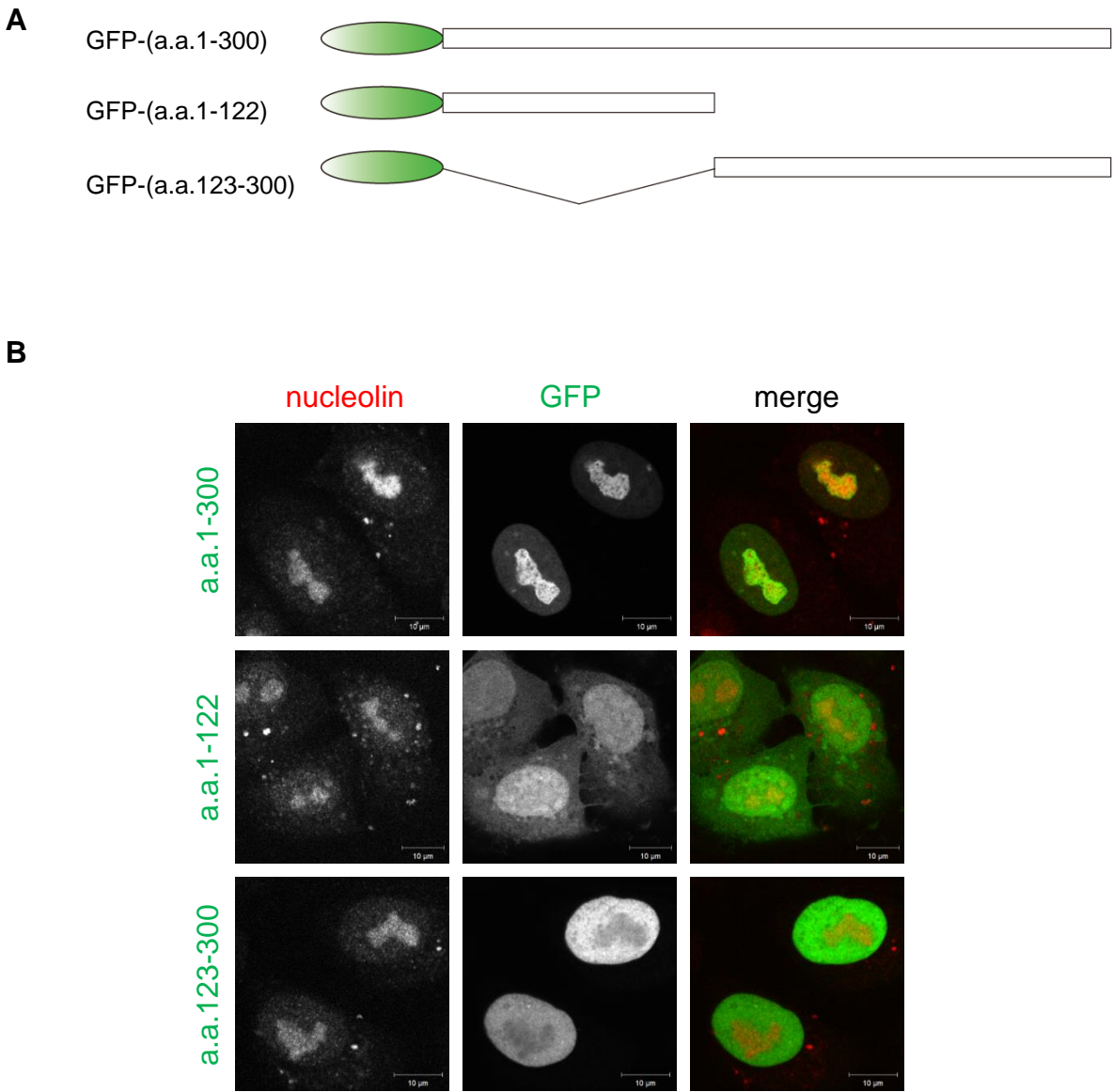


図10 MAK16の核小体局在機構

(A) 作製したMAK16のGFP融合欠失変異体の模式図。(B) それぞれの欠失変異体をHeLa細胞で発現させ、その局在を蛍光顕微鏡により観察した。それぞれ核小体タンパク質であるnucleolinの局在と比較した。スケールバーは10μmである。

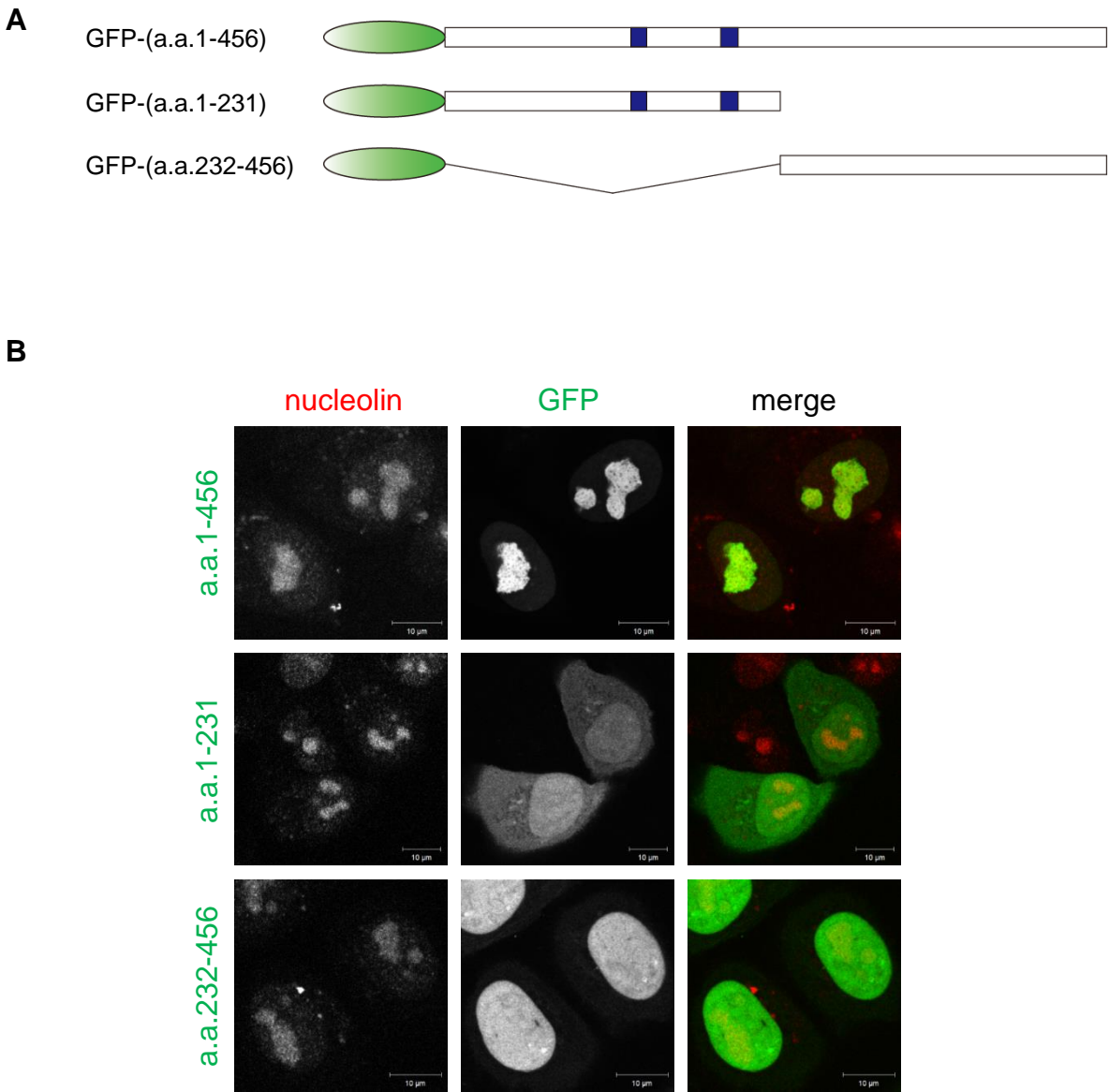
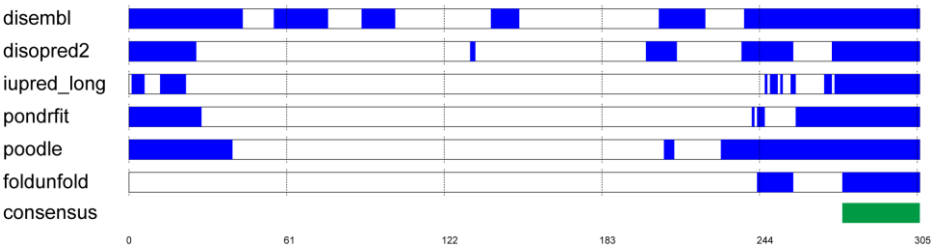


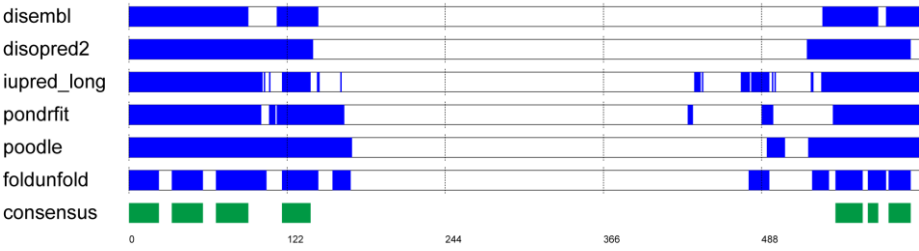
図11 KIAA0409の核小体局在機構

(A) 作製したKIAA0409のGFP融合欠失変異体の模式図。予測された核移行シグナルは青で示した。(B) それぞれの欠失変異体をHeLa細胞で発現させ、その局在を蛍光顕微鏡により観察した。それぞれ核小体タンパク質であるnucleolinの局在と比較した。スケールバーは10μmである。

BXDC1



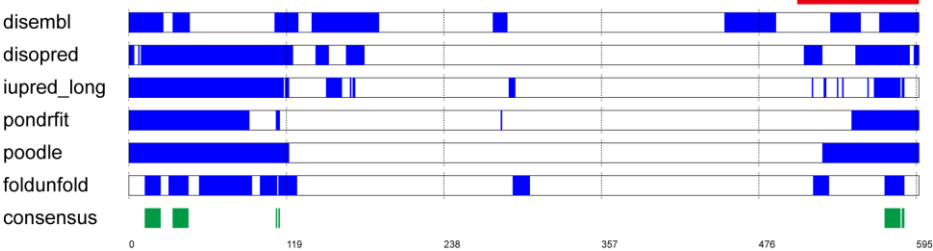
WDR46



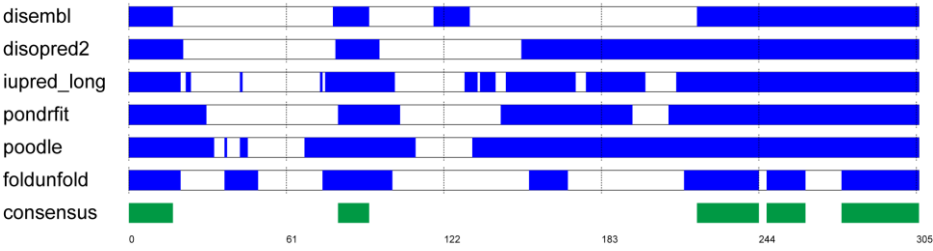
NOL10



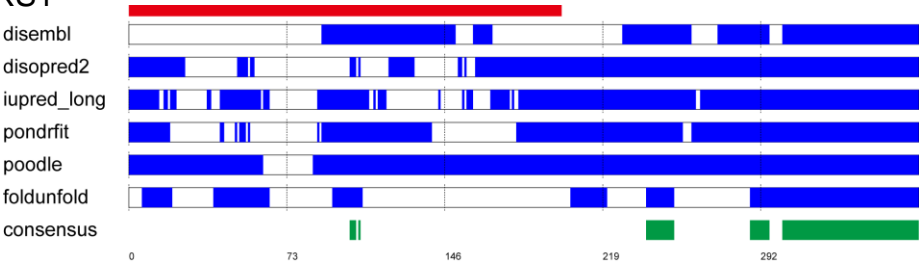
WDSOF1



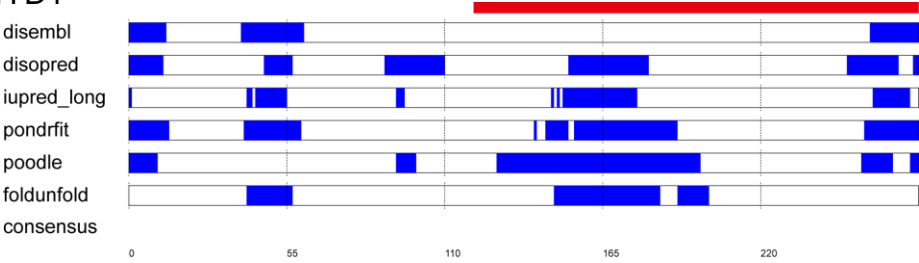
EBP2



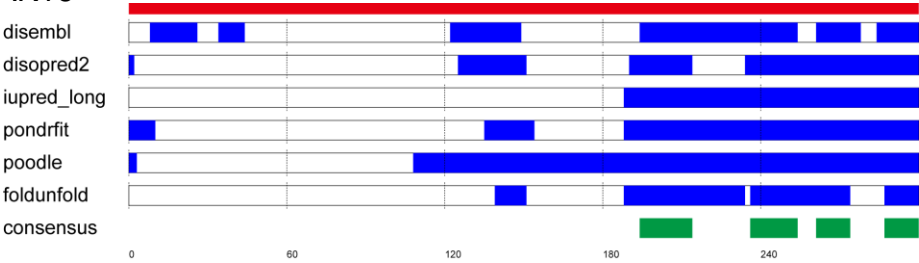
RRS1



GIYD1



MAK16



KIAA0409

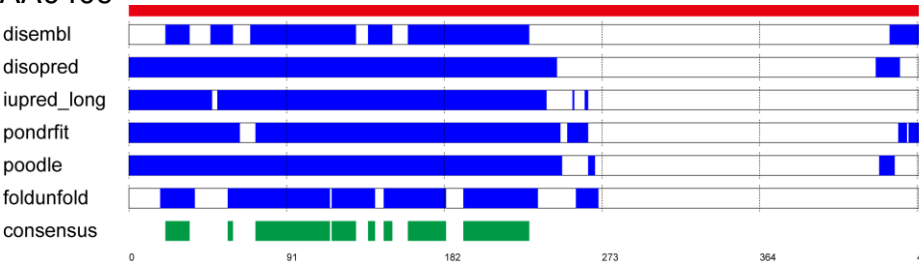
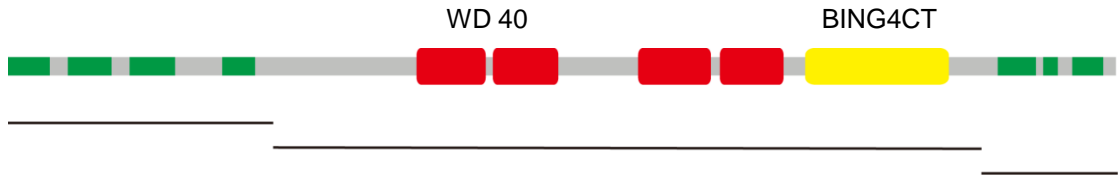


図12 着目したタンパク質の核小体局在機構とそれらの天然変性領域との関係

着目したタンパク質それぞれに対し、DisEMBL、DISOPRED2、IUPred、PONDR-FIT、POODLEおよびFoldUnfoldの6つの予測プログラムから天然変性領域と予測された領域を青で示した。さらに、6つすべてのプログラムから天然変性領域であると予測された領域をconsensusとし、緑で示した。図3から図11で明らかになった、それぞれのタンパク質の核小体局在に重要な領域を赤で示した。

A



B

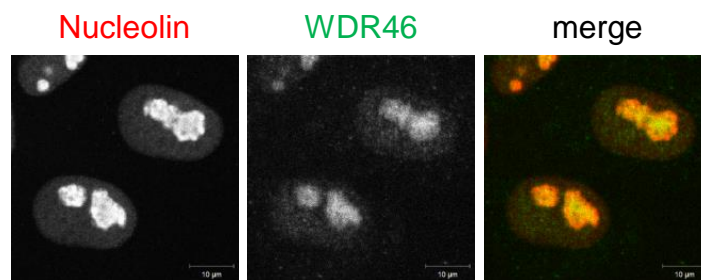


図13 WDR46のドメイン構造およびその局在

(A) WDR46のドメイン構造。SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) により予測されたWD 40ドメインを赤で、BING4CTドメインを黄で、図12でconsensusの天然変性領域とした領域を緑で示した。また図17において使用した3種の欠失変異体に該当する領域を黒のラインで示した。(B) HeLa 細胞に対し抗WDR46抗体、および核小体マーカーである抗ヌクレオリン抗体を用いて免疫染色を行った。スケールバーは10μmである。

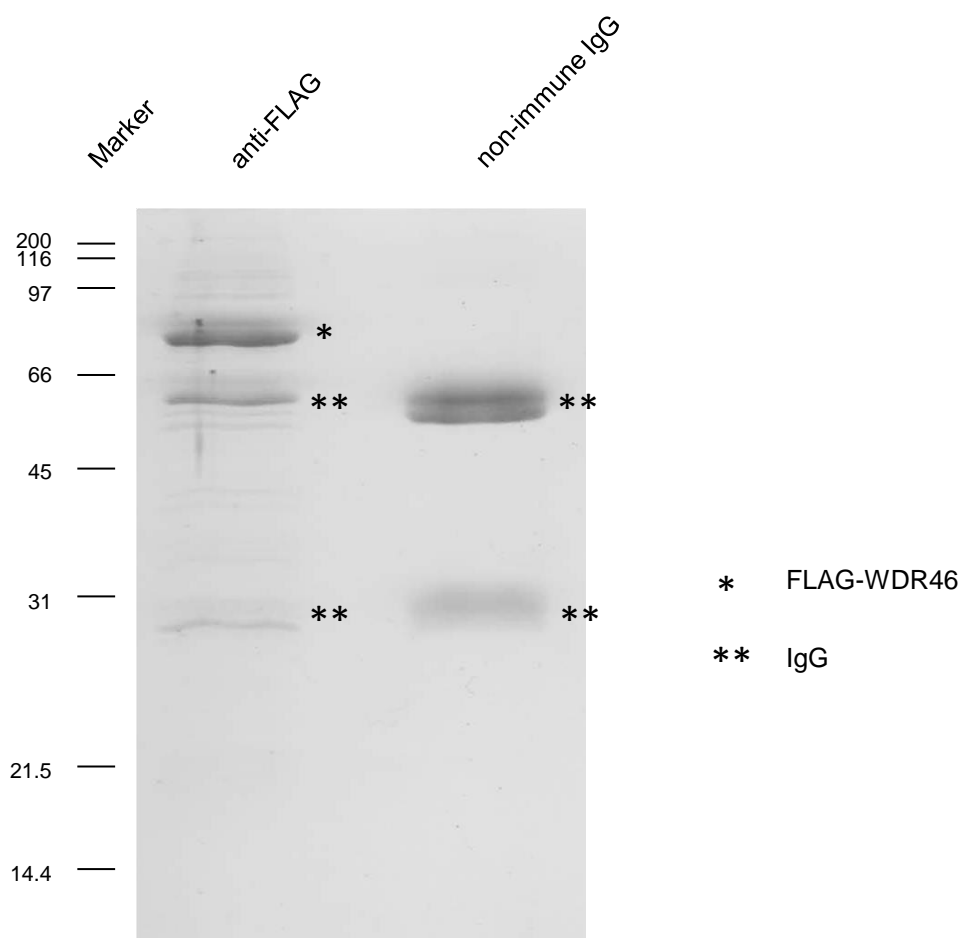


図14 WDR46の結合タンパク質の同定

FLAGタグを付加したWDR46 (FLAG-WDR46)をHeLa細胞で発現させ、抗FLAG抗体を用いてFLAG-WDR46の複合体を免疫沈降し、そこに含まれるタンパク質の同定を質量分析により行った。図は抗FLAG抗体および非免疫IgGによる免疫沈降産物をSDS-PAGEにかけ、CBB染色によりタンパク質を検出したものである。*はFLAG-WDR46を、**はIgGを示している。

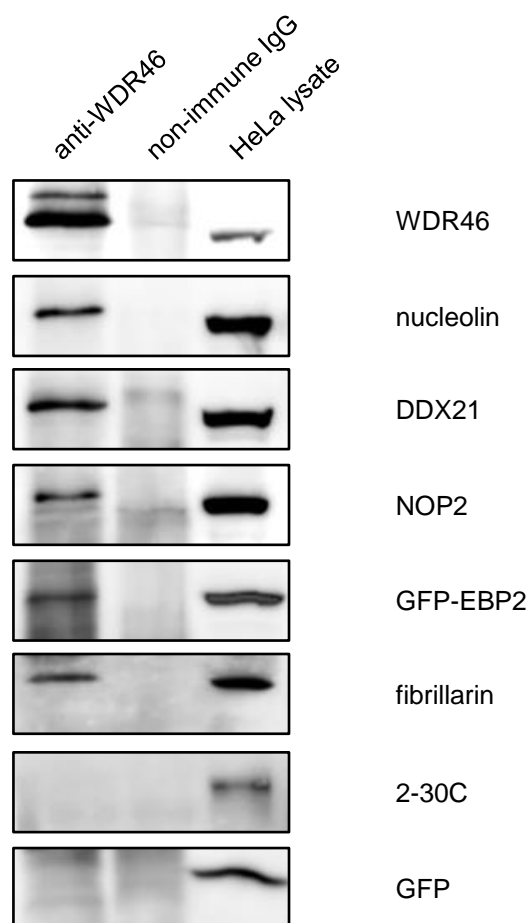


図15 内在性のWDR46とその結合パートナーとの相互作用

抗WDR46抗体を用い、HeLa細胞よりWDR46の複合体を免疫沈降した。免疫沈降産物をSDS-PAGEにかけ、抗WDR46、nucleolin、DDX21、NOP2、fibrillarin抗体およびモノクローナル抗体2-30を用いウェスタンブロッティングを行った。2-30C抗原は核小体のFCに局在するタンパク質であり、本実験のネガティブコントロールである。あるいはGFP-EBP2およびGFPをHeLa細胞で発現させ、上記の免疫沈降を行い、抗GFP抗体を用いたウェスタンブロッティングにより各タンパク質を検出した。

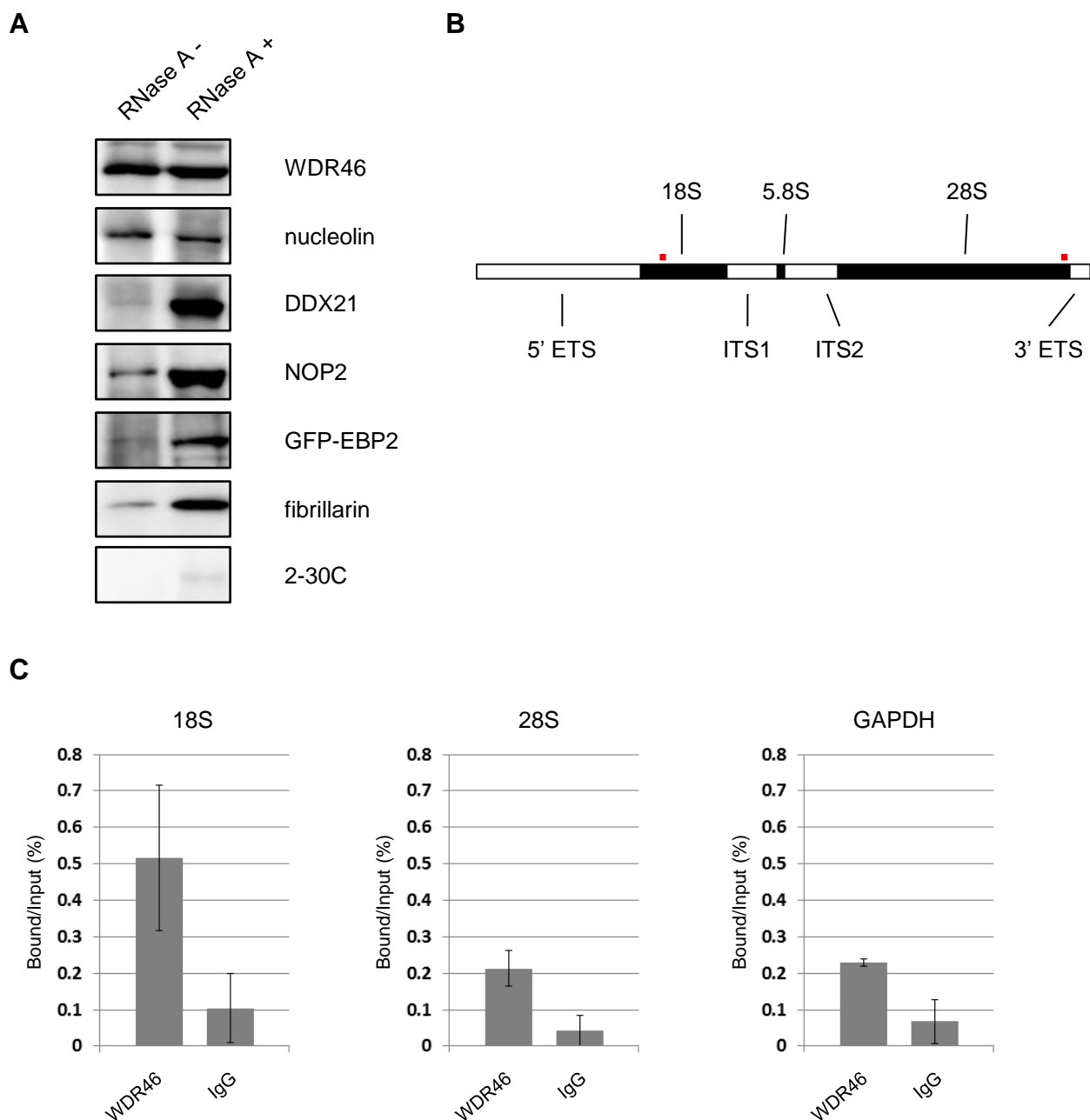
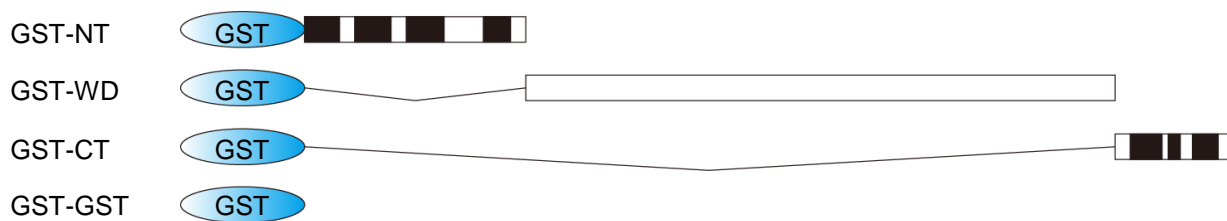


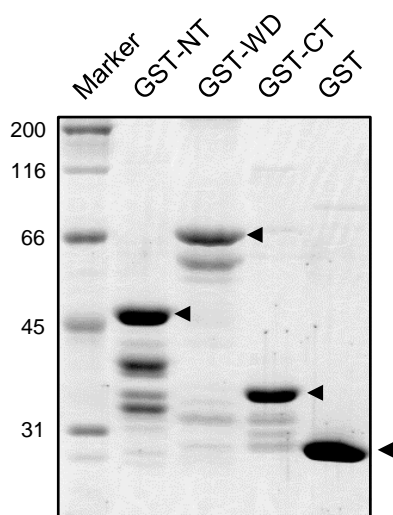
図16 WDR46複合体に対するRNAの関与

(A) 抗WDR46抗体を用いた免疫沈降をRNase Aの非存在下および存在下で行った。図は抗WDR46による免疫沈降画分を示している。(B) リボソームDNAの転写産物の模式図。以下Cの定量PCRにおける18S rRNAおよび28S rRNAのアンプリコンを赤で示した。(C) 免疫沈降によって得られたWDR46の複合体に含まれるRNAを精製し、18S rRNA、28S rRNAおよびGAPDHのmRNAの量を定量PCRによりモニターした。エラーバーは3回の独立した免疫沈降実験による標準偏差を示している。

A



B



C

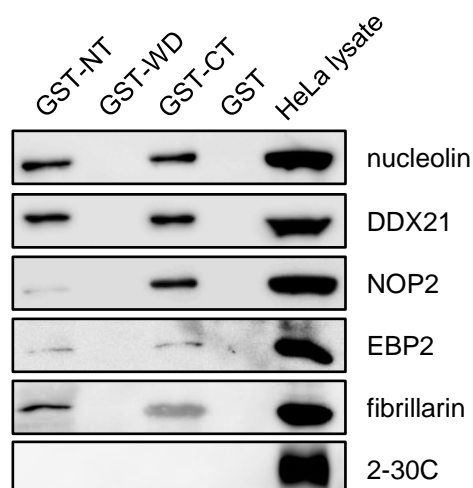
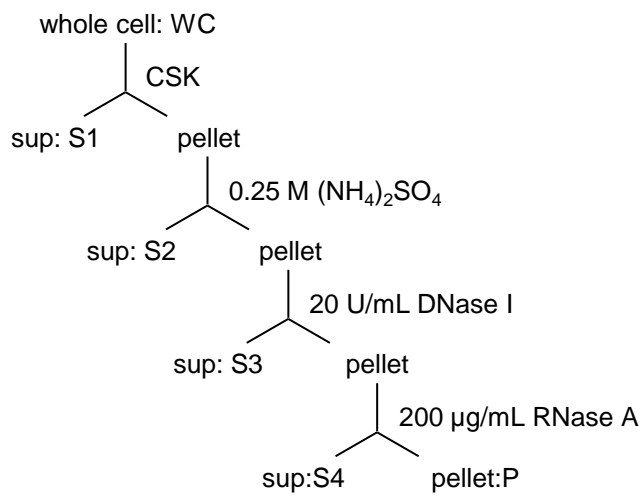


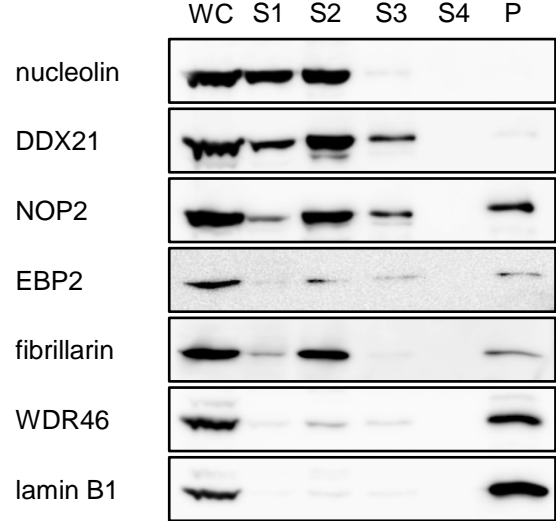
図17 WDR46は自身の天然変性領域を介して結合パートナーと相互作用する。

(A) 下記に記すプルダウンアッセイで用いた各GST融合タンパク質の模式図。NTはWDR46のa.a.1-146、WDはa.a.147-535、CTはa.a.536-610をそれぞれ示している。また、図12で示したconsensusの天然変性領域を黒い四角で示した。(B) Aで示した各GST融合タンパク質を大腸菌で発現させ、精製したものをSDS-PAGEにかけ、CBB染色によりタンパク質を検出した。目的のタンパク質を矢頭により示した。(C) Bで示した各GST融合タンパク質およびHeLa細胞抽出液を用いプルダウンアッセイを行った。各GST融合タンパク質の結合タンパク質はウェスタンブロッティングにより検出した。

A



B



C

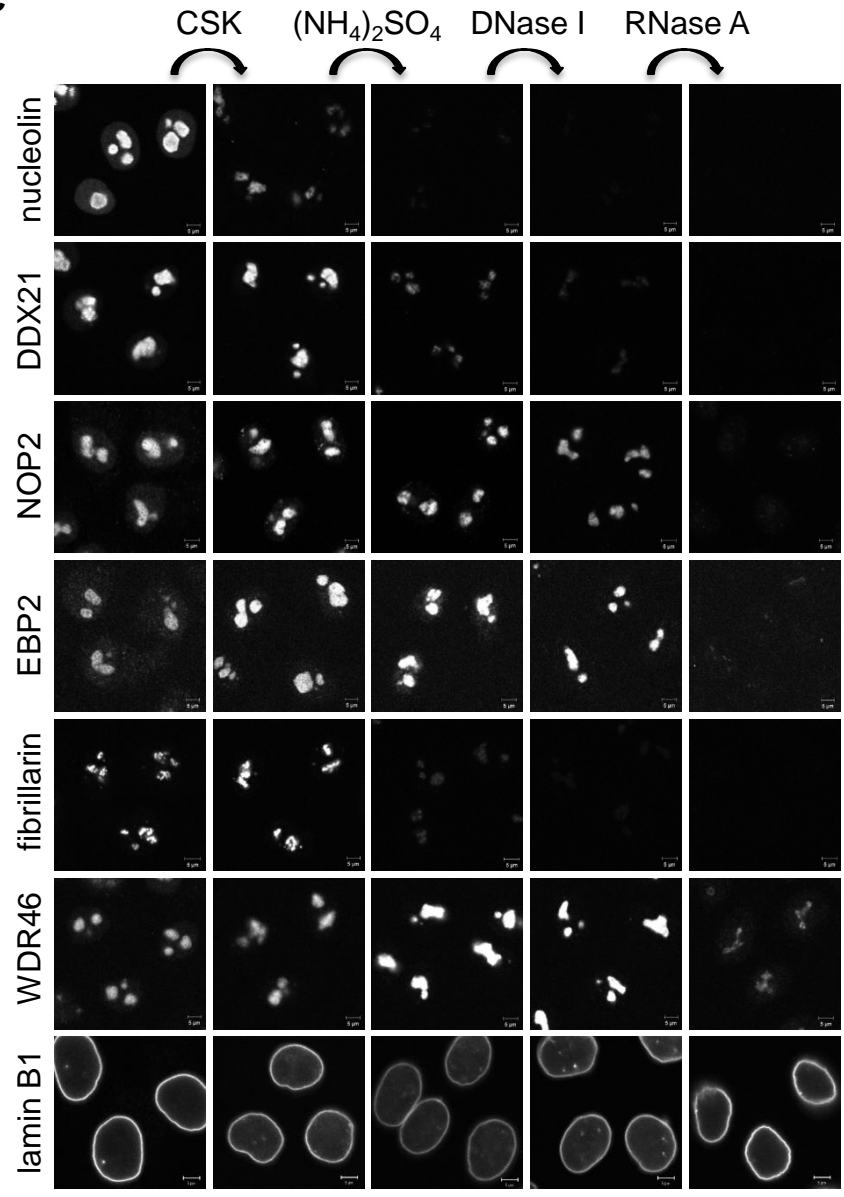


図18 WDR46は高度に難溶性の核小体タンパク質である。

(A) 段階的生化学処理の模式図。回収したHeLa細胞に対し、CSKバッファー処理 (0.5% Triton X-100含む)、高塩バッファー処理 (0.25M 硫酸アンモニウム含む)、DNase I処理および引き続くRNase A処理を行った。(B) Aに示したWhole Cell (WC)、S1、S2、S3、S4およびpellet (P)それぞれのフラクションをSDS-PAGEにかけ、抗nucleolin、DDX21、NOP2、EBP2、fibrillarin、WDR46およびlamin B1抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。(C) カバーガラス上で培養したHeLa細胞に対し、Aで示した段階的生化学処理を行った後、免疫蛍光染色を行った。スケールバーは5 μ mである。

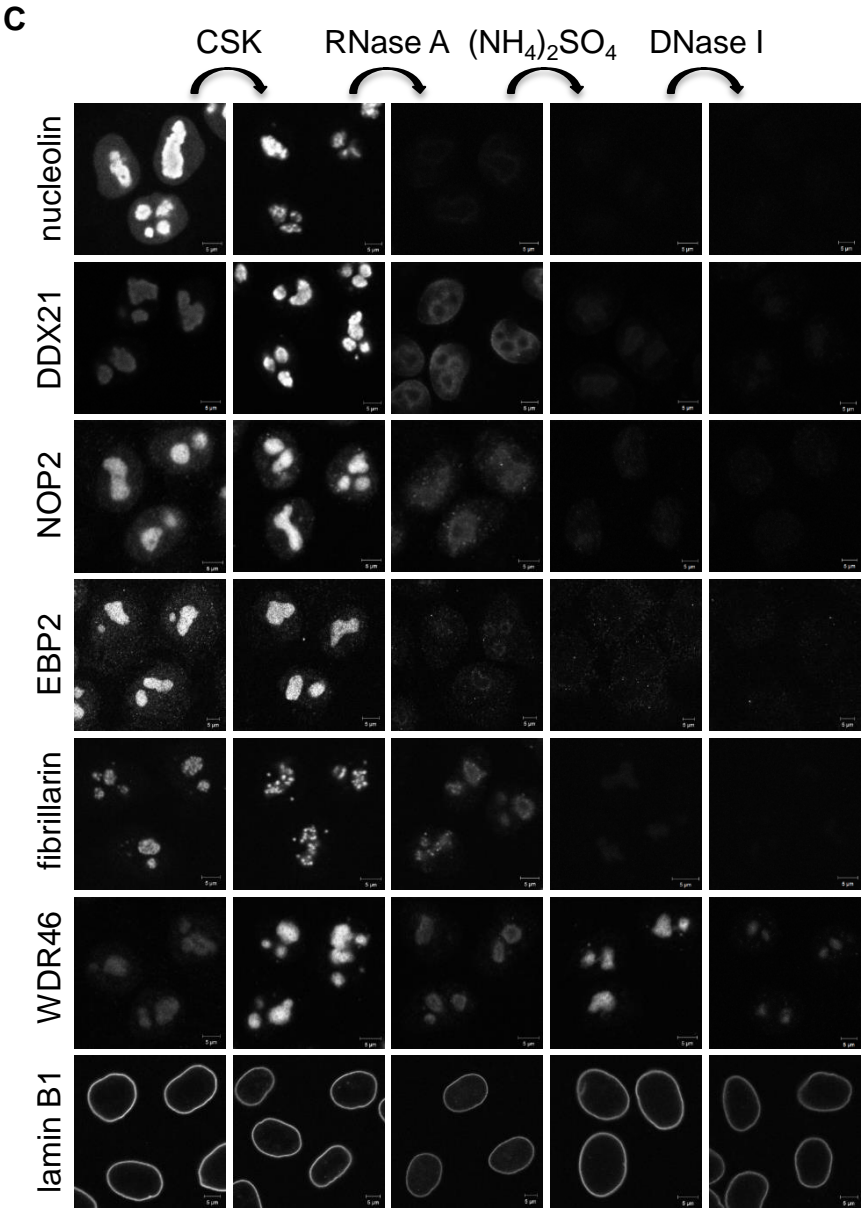
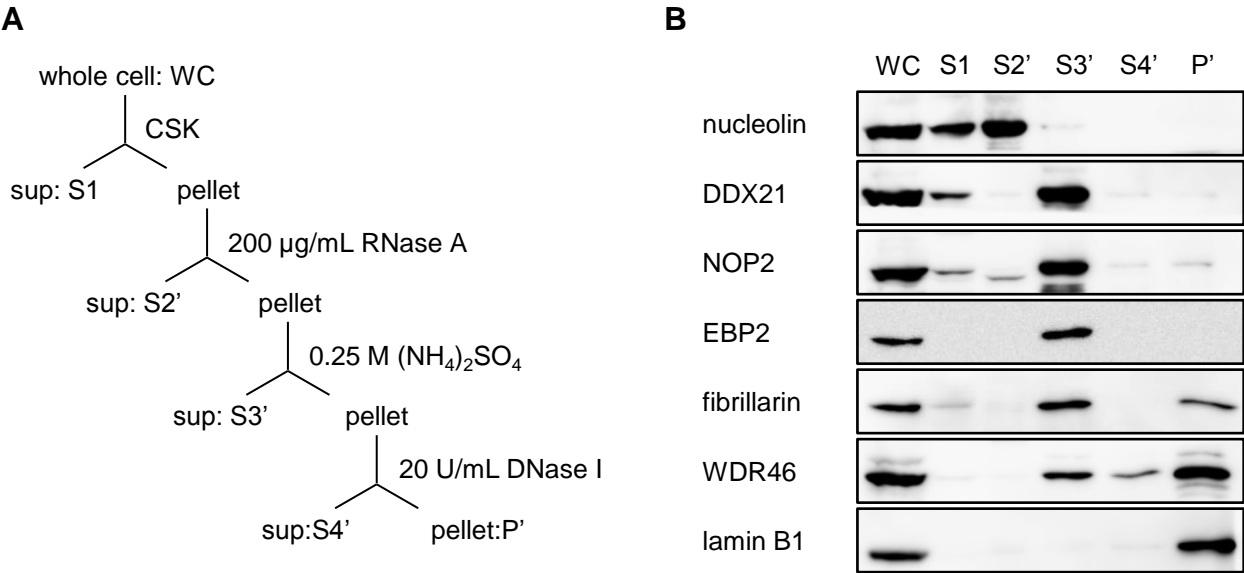


図19 WDR46はRNase Aを先に作用させる代替法でも難溶性画分に残るタンパク質である。

(A) 段階的生化学処理の模式図。回収したHeLa細胞に対し、CSKバッファー、RNase A処理、高塩バッファー処理、および引き続くDNase I処理を行った。(B) Aに示したWC、S1、S2'、S3'、S4'およびP'それぞれのフラクションをSDS-PAGEにかけ、抗nucleolin、DDX21、NOP2、EBP2、fibrillarin、WDR46およびlamin B1抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。(C) カバーガラス上で培養したHeLa細胞に対し、Aで示した段階的生化学処理を行った後、免疫蛍光染色を行った。スケールバーは5 μ mである。

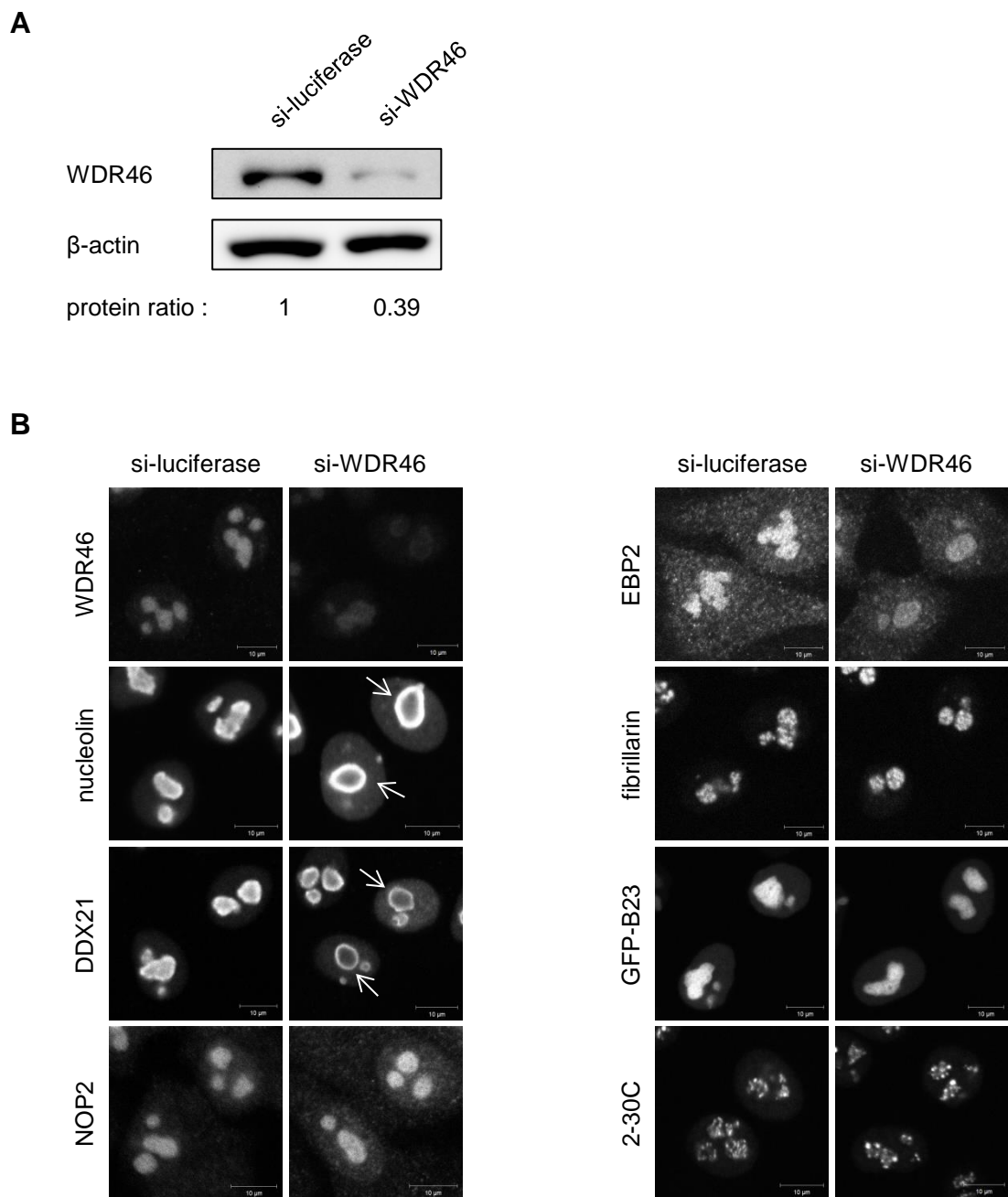


図20 WDR46のノックダウンによるnucleolin およびDDX21の局在変化

(A) luciferaseおよびWDR46に対するsiRNAをHeLa細胞に導入し、24時間後回収した細胞をSDS-PAGEにかけ、抗WDR46およびβ-actin抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。(B) siRNAによるWDR46ノックダウン時におけるWDR46、nucleolin、DDX21、NOP2、EBP2、fibrillarin、および2-30C抗原の局在を免疫蛍光染色により観察した。B23に関してはGFPのシグナルを観察した。矢印はnucleolinおよびDDX21に見られた核小体の縁への局在を示している。スケールバーは10μmである。

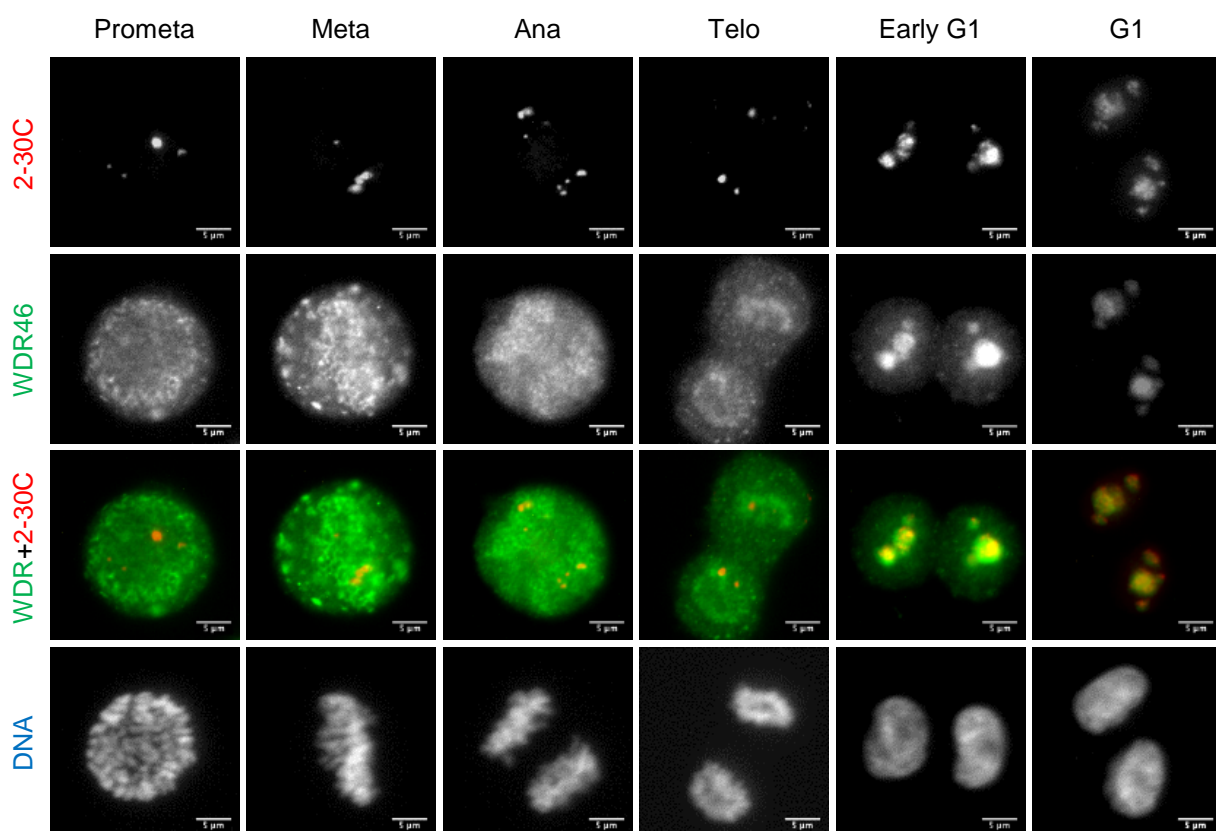


図21 分裂期における核小体再構築の際の、WDR46と2-30C抗原との挙動の比較

HeLa細胞をノコダゾールにより同調培養し、prometa、meta、ana、telo、early G1およびG1 phaseでのWDR46およびFCタンパク質である2-30C抗原の局在を蛍光抗体染色により観察した。スケールバーは5 μ mである。

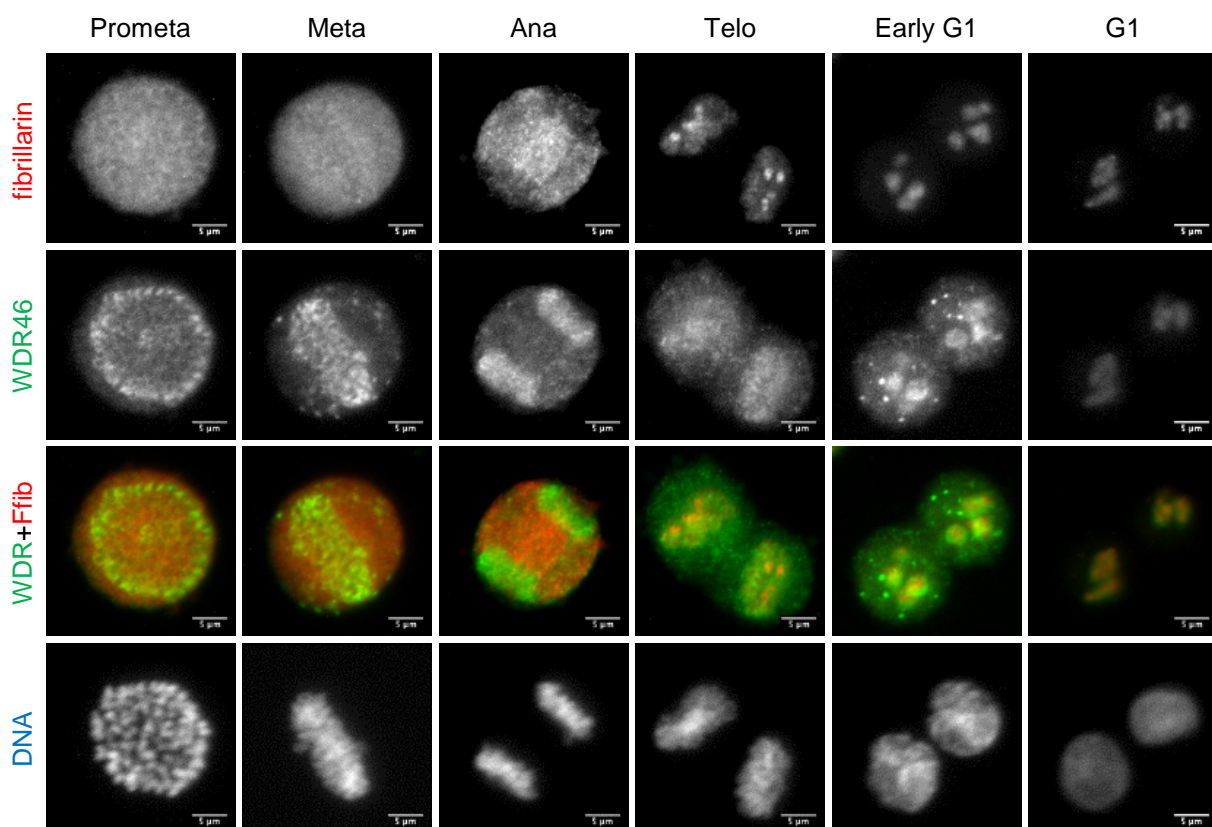


図22 分裂期における核小体再構築の際の、WDR46とfibrillarinとの挙動の比較

HeLa細胞をノコダゾールにより同調培養し、prometa、meta、ana、telo、early G1およびG1 phaseでのWDR46およびDFCタンパク質であるfibrillarinの局在を蛍光抗体染色により観察した。スケールバーは5μmである。

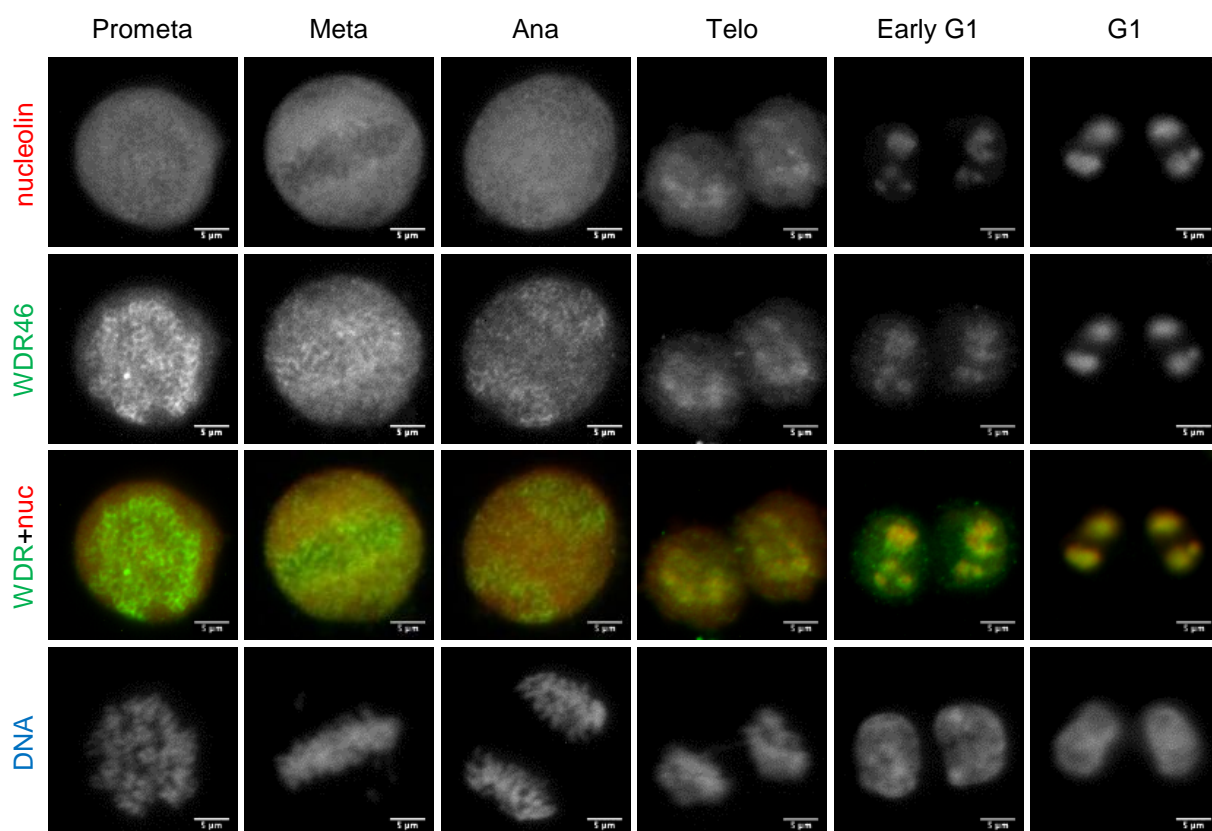


図23 分裂期における核小体再構築の際の、WDR46とnucleolinとの挙動の比較

HeLa細胞をノコダゾールにより同調培養し、prometa、meta、ana、telo、early G1およびG1 phaseでのWDR46およびGCタンパク質であるnucleolinの局在を蛍光抗体染色により観察した。スケールバーは5μmである。

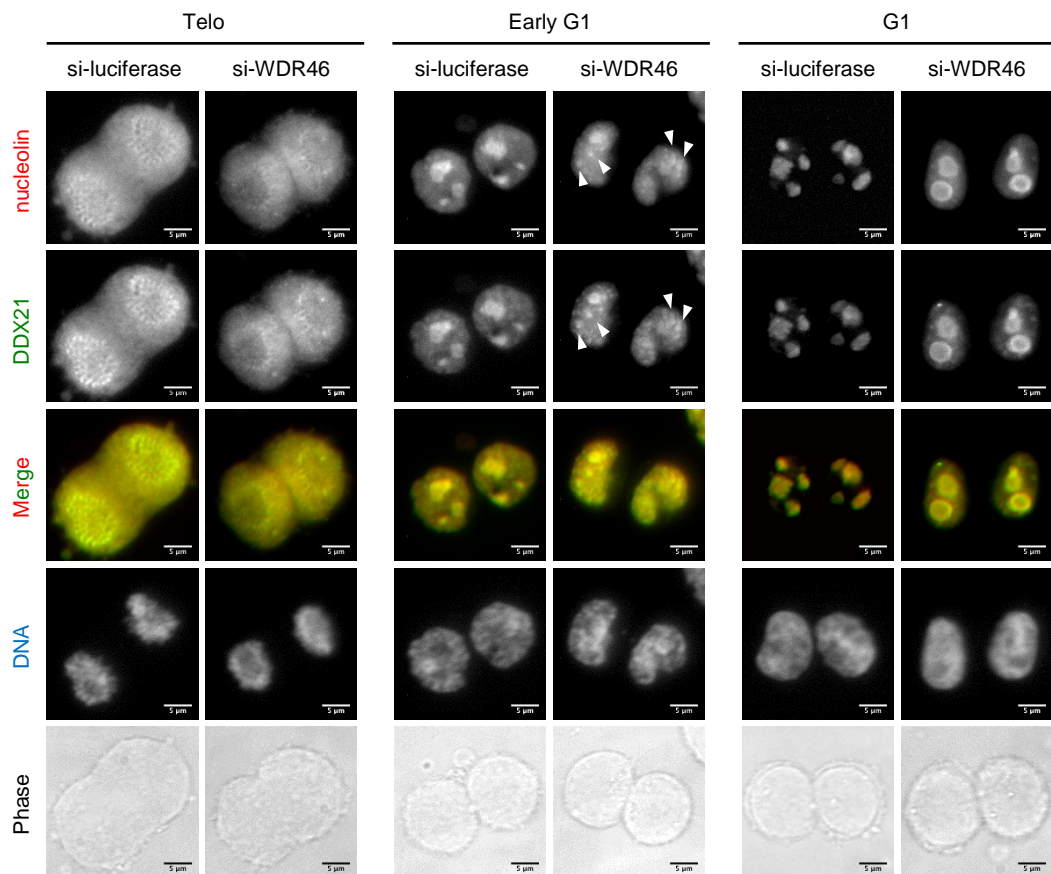
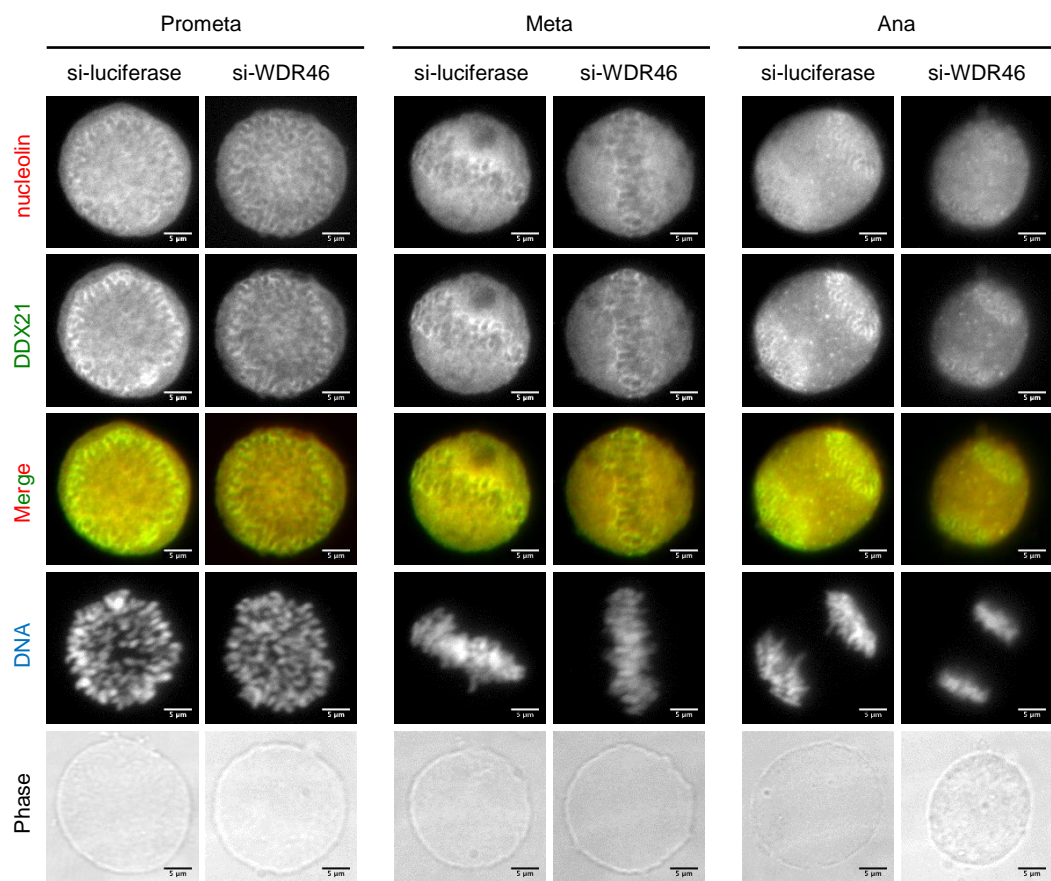


図24 WDR46は分裂期終了に伴う nucleolinおよびDDX21の新生核小体への正常な集積を決定している。

luciferaseおよびWDR46に対するsiRNAをHeLa細胞に導入し、20時間後ノコダゾール処理により分裂期で同調した。ノコダゾール処理4時間後に細胞をリリースし、prometa、meta、ana、telo、early G1およびG1 phaseにおけるnucleolinおよびDDX21の局在を、免疫蛍光染色により観察した。矢頭はearly G1 phaseにおいても観察されるPNBを示している。スケールバーは5 μ mである。

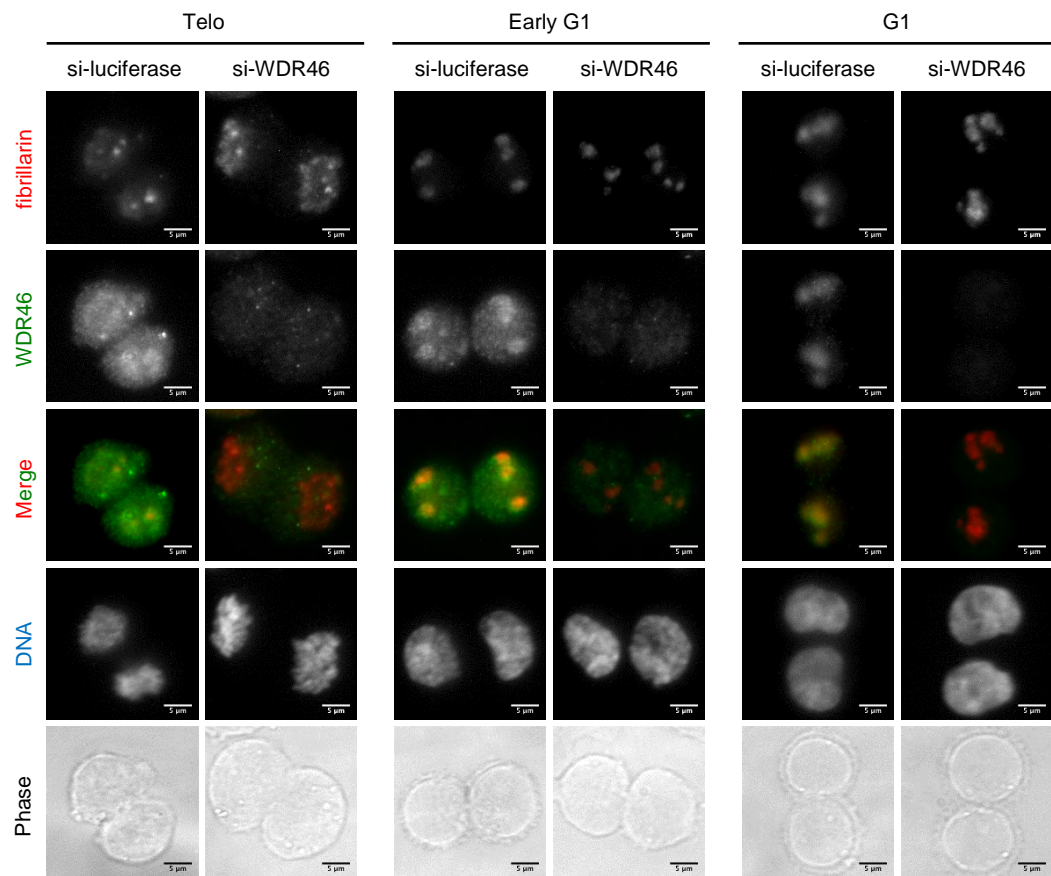
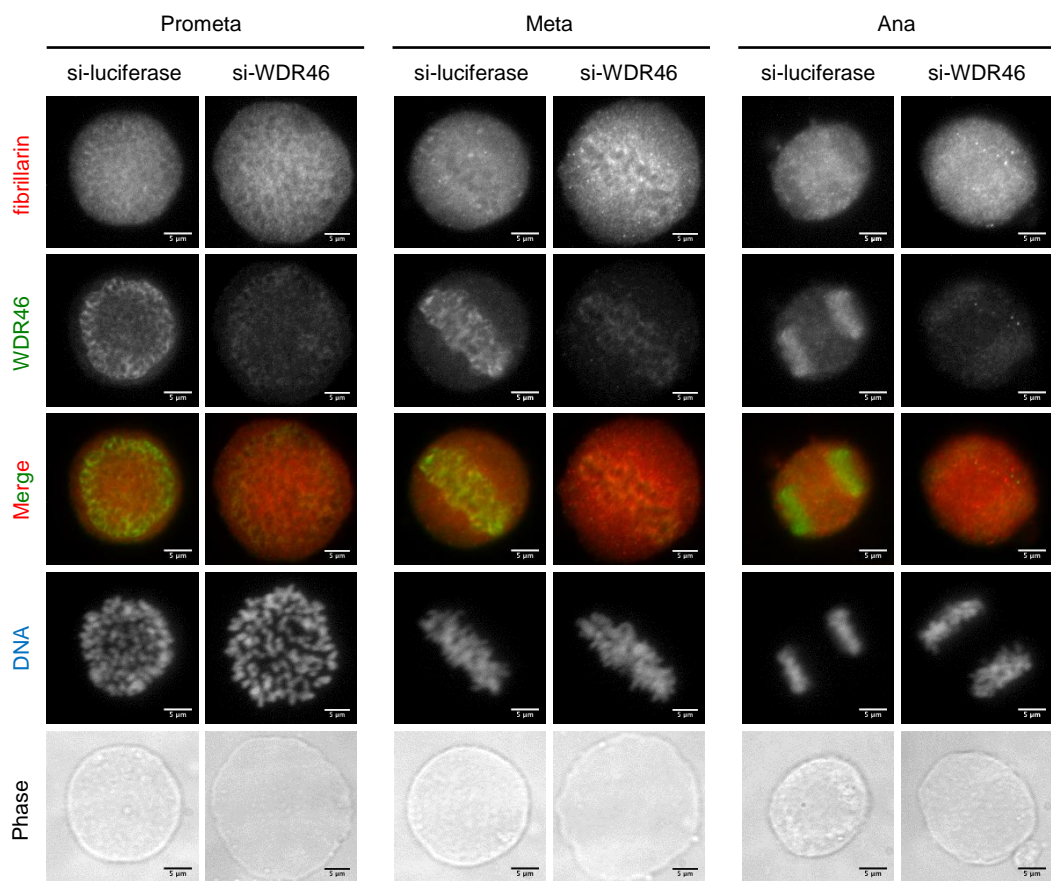
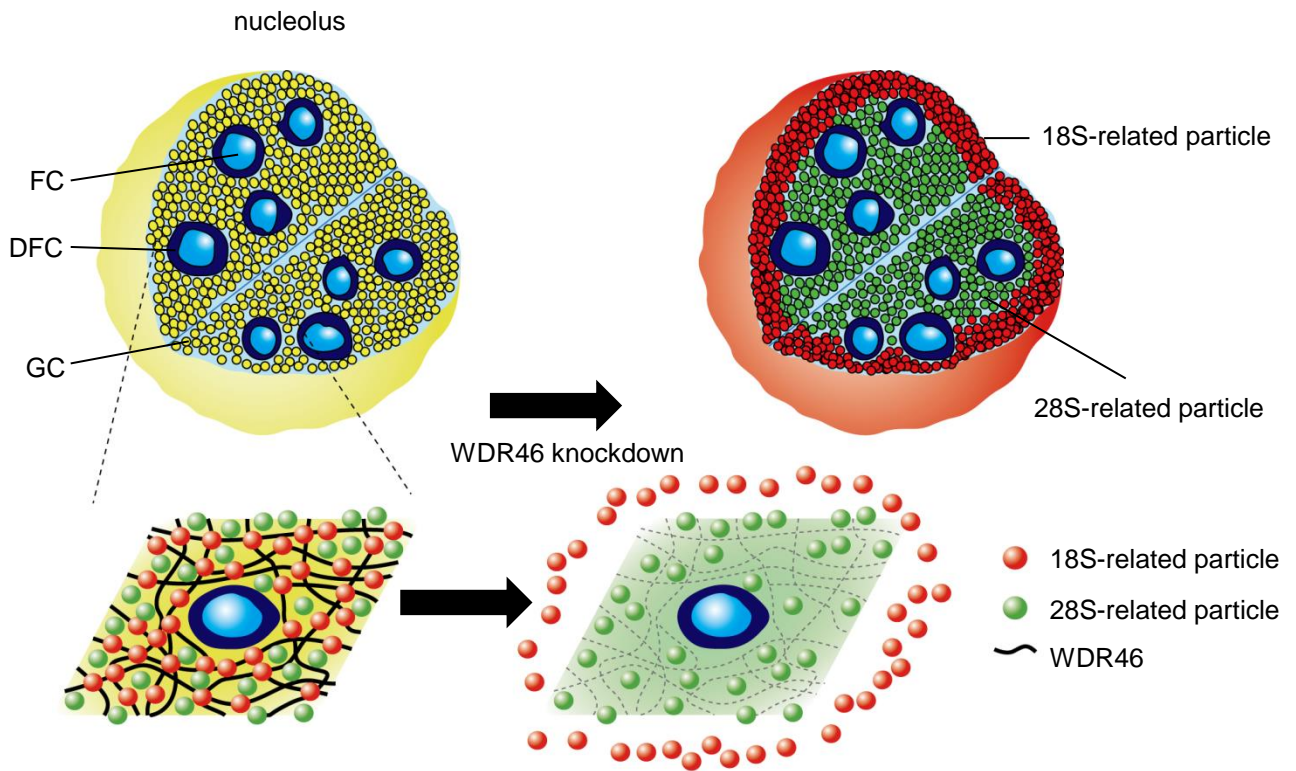


図25 WDR46は分裂期終了に伴う fibrillarinの新生核小体への正常な集積には関与していない。

図24と同様にHeLa細胞を処理し、prometa、meta、ana、telo、early G1およびG1 phaseにおけるWDR46およびfibrillarinの局在を、免疫蛍光染色により観察した。スケールバーは5 μ mである。

A



B

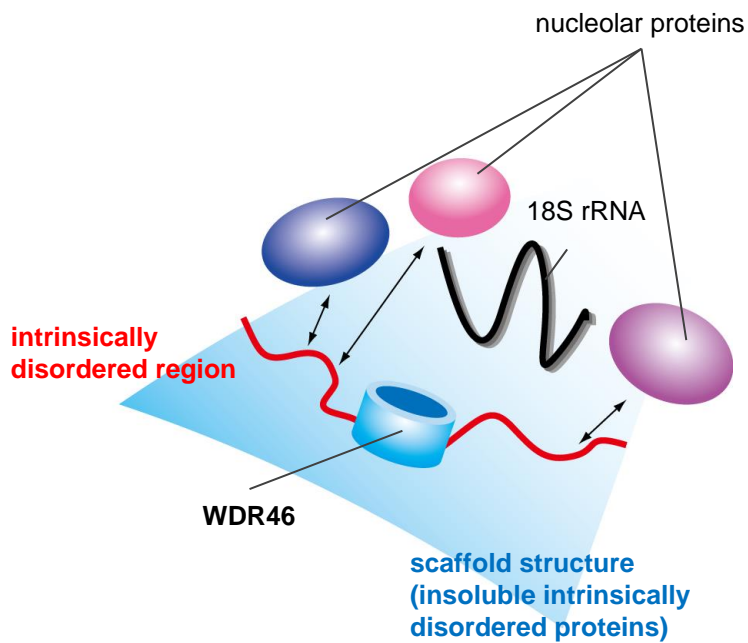


図26 核小体スキャフォールドのモデル図

(A) WDR46のノックダウンにより観察された現象の模式図。WDR46のノックダウンにより、18S rRNAのプロセッシングに関与する因子であるnucleolinおよびDDX21の局在はGCから核小体の縁に変化した。この現象により、以下に示す作業仮説が導き出される。すなわち、GC(黄)はさらに18S-related particle(赤)および28S-related particle(緑)といった2つの領域に分けられる。WDR46は18S-related particleの正常な配置に重要な役割を果たしている。(B) 18S-related particleのスキャフォールドのモデル図。WDR46は中央付近のWD40 domain(青の円柱)および両末端の2つの天然変性領域(赤の波線)からなる。天然変性領域がその結合パートナーとの結合を通し、核小体のスキャフォールドのハブとして機能している。

IPi accession number	Gene symbol	M.W. (Da)	emPAI	nucleolus (UniProt)
IPi00021266	RPL23A;SNORD4A 60S ribosomal protein L23a	17684	3.88	
IPi00640040	- 68kDa protein	67971	2.99	
IPi00790342	RPL6 60S ribosomal protein L6	32871	2.68	
IPi00217467	HIST1H1E Histone H1.4	21852	2.09	
IPi00030179	RPL7P32;RPL7 60S ribosomal protein L7	29207	2	
IPi00477179	DDX21 Isoform 2 of Nucleolar RNA helicase 2	79607	1.98	o
IPi00215719	RPL18 60S ribosomal protein L18	21621	1.66	
IPi00299573	RPL7A;SNORD24 60S ribosomal protein L7a	29977	1.59	
IPi00419373	HNRNPA3 Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	39571	1.48	o
IPi00604620	NCL Nucleolin	76568	1.46	o
IPi00031812	YBX1 Nuclease-sensitive element-binding protein 1	35903	1.46	
IPi00879006	RRP7A Ribosomal RNA-processing protein 7 homolog A	32314	1.42	
IPi00018810	OASL Isoform p56 of 59 kDa 2--5--oligoadenylate synthase-like protein	59189	1.35	o
IPi00216049	HNRNPK Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	50944	1.34	
IPi00025039	FBL rRNA 2--O-methyltransferase fibrillarin	33763	1.33	o
IPi00909509	- cDNA FLJ59138, highly similar to Annexin A2	21656	1.26	
IPi00655650	RPS26 40S ribosomal protein S26	13007	1.22	
IPi00005198	ILF2 Interleukin enhancer-binding factor 2	43035	1.12	o
IPi00216587	RPS8;SNORD55 40S ribosomal protein S8	24190	1.08	
IPi00745955	EBNA1BP2 Probable rRNA-processing protein EBP2	34830	1.05	o
IPi00479509	TYBX1 RcnSEPI (Fragment)	35435	1.03	
IPi00984708	- Similar to Ig kappa chain V-II region GM607 precursor	14630	1.03	
IPi00179964	PTBP1 Isoform 1 of Polypyrimidine tract-binding protein 1	57186	1	o
IPi00181728	BRX1 Ribosome biogenesis protein BRX1 homolog	41375	1	o
IPi00911039	HSPA1B;HSPA1A cDNA FLJ54408, highly similar to Heat shock 70 kDa protein 1	63885	0.97	
IPi00011253	RPS3 40S ribosomal protein S3	26671	0.95	
IPi00007144	RPL26L1 60S ribosomal protein L26-like 1	17246	0.84	
IPi00332936	ZC3HAV1 Isoform 2 of Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1	77853	0.83	
IPi00304692	RBMX Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G	42306	0.81	
IPi01020720	HSPA1B;HSPA1A cDNA FLJ54328, highly similar to Heat shock 70 kDa protein 1	67490	0.8	
IPi00023126	VDR46 WD repeat-containing protein 46	68029	0.79	
IPi00010204	SRSF3 Serine/arginine-rich splicing factor 3	19318	0.73	
IPi00294891	NOP2 Isoform 1 of Putative ribosomal RNA methyltransferase NOP2	89247	0.7	o
IPi00976550	MTDH Protein	6450	0.66	
IPi00984839	DDX3X ATP-dependent RNA helicase DDX3X isoform 2	73111	0.64	
IPi00021840	RPS6 40S ribosomal protein S6	28663	0.64	o
IPi00152890	NOL6 Isoform 1 of Nucleolar protein 6	127513	0.62	o
IPi00791426	RPL24 Uncharacterized protein	14360	0.62	
IPi00400922	PDCD11 Protein RRP5 homolog	208570	0.6	o
IPi00021924	H1FX Histone H1x	22474	0.6	
IPi00217468	HIST1H1B Histone H1.5	22566	0.6	
IPi00410714	HBA2;HBA1 Hemoglobin subunit alpha	15248	0.58	
IPi00003918	RPL4 60S ribosomal protein L4	47667	0.57	o
IPi00029750	RPS24 Isoform 1 of 40S ribosomal protein S24	15413	0.57	o
IPi00000643	BAG2 BAG family molecular chaperone regulator 2	23757	0.56	
IPi00555744	RPL14 Ribosomal protein L14 variant	23772	0.56	
IPi00470528	RPL15 60S ribosomal protein L15	24131	0.55	
IPi00218606	RPS23 40S ribosomal protein S23	15798	0.55	
IPi00219155	RPL27 60S ribosomal protein L27	15788	0.55	
IPi00744135	RRBP1 Isoform 2 of Ribosome-binding protein 1	108565	0.54	
IPi00021439	ACTB Actin, cytoplasmic 1	41710	0.54	
IPi00412579	RPL10A 60S ribosomal protein L10a	24816	0.53	
IPi00026271	RPS14 40S ribosomal protein S14	16263	0.53	o
IPi00220344	RPL36A 60S ribosomal protein L36a isoform a	16368	0.53	
IPi01014186	NOL6 cDNA FLJ58527, highly similar to Nucleolar protein 6	121973	0.52	
IPi00456758	RPL27A 60S ribosomal protein L27a	16551	0.52	
IPi00339269	HSPA6 Heat shock 70 kDa protein 6	70984	0.5	
IPi00027270	RPL26 60S ribosomal protein L26	17248	0.5	
IPi00644079	HNRNPU cDNA FLJ44920 fis, clone BRAMY3011501, highly similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	83033	0.48	
IPi00008708	RSL1D1 Ribosomal L1 domain-containing protein 1	54939	0.48	o

IPI accession number	Gene symbol	M.W. (Da)	emPAI	nucleolus (UniProt)
IPI00003881	HNRNPF Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	45643	0.48	
IPI00215884	SRSF1 Isoform ASF-1 of Serine/arginine-rich splicing factor 1	27728	0.47	
IPI00297779	CCT2 T-complex protein 1 subunit beta	57452	0.46	
IPI00247583	RPL21;SNORD102;SNORA27;RPL21P19 60S ribosomal protein L21	18553	0.46	
IPI00643152	HSPA1L cDNA FLJ56386, highly similar to Heat shock 70 kDa protein 1L	77513	0.45	
IPI00844578	DXH9 ATP-dependent RNA helicase A	140869	0.44	o
IPI00302925	CCT8 59 kDa protein	59440	0.44	
IPI00220740	NPM1 Isoform 2 of Nucleophosmin	29446	0.44	o
IPI00217030	RPS4X 40S ribosomal protein S4, X isoform	29579	0.44	
IPI00008524	PABPC1 Isoform 1 of Polyadenylate-binding protein 1	70626	0.43	
IPI00376798	RPL11 Isoform 1 of 60S ribosomal protein L11	20240	0.42	o
IPI00011913	HNRNPA0 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	30822	0.41	
IPI00909956	- cDNA FLJ59103, highly similar to T-complex protein 1 subunit epsilon	32031	0.4	
IPI00549540	PAK1IP1 p21-activated protein kinase-interacting protein 1	43936	0.39	o
IPI00216592	HNRNPC Isoform C1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	32318	0.39	
IPI00410324	LSM12 Isoform 1 of Protein LSM12 homolog	21687	0.39	
IPI00301503	TRA2B Isoform 1 of Transformer-2 protein homolog beta	33646	0.38	
IPI00017617	DDX5 Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	69105	0.37	
IPI00027626	CCT6A T-complex protein 1 subunit zeta	57988	0.37	
IPI00154590	MKI67IP MKI67 FHA domain-interacting nucleolar phosphoprotein	34201	0.37	o
IPI00009071	LOC100505793;SRSF10 Isoform 3 of Serine/arginine-rich splicing factor 10	22209	0.37	
IPI00290566	TCP1 T-complex protein 1 subunit alpha	60306	0.35	
IPI00026230	HNRNPH2 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	49232	0.34	
IPI00005705	PPP1CC Isoform Gamma-1 of Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit	36960	0.34	o
IPI00477971	TBL3 Transducin beta-like protein 3	88978	0.33	o
IPI00293078	DDX27 Probable ATP-dependent RNA helicase DDX27	89779	0.33	
IPI00984879	ACTA2 cDNA FLJ52761, highly similar to Actin, aortic smooth muscle	37339	0.33	
IPI00411680	PCMT1 Isoform 1 of Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase	24621	0.33	
IPI00651653	DDX17 probable ATP-dependent RNA helicase DDX17 isoform 3	80407	0.31	
IPI00418471	VIM Vimentin	53619	0.31	
IPI00010105	EIF6 Eukaryotic translation initiation factor 6	26582	0.31	o
IPI00003377	SRSF7 Isoform 1 of Serine/arginine-rich splicing factor 7	27350	0.3	
IPI00219160	RPL34 60S ribosomal protein L34	13284	0.3	
IPI00304187	RBM28 RNA-binding protein 28	85685	0.29	o
IPI00012772	RPL8 60S ribosomal protein L8	28007	0.29	
IPI00063242	PGAM5 Isoform 2 of Serine/threonine-protein phosphatase PGAM5, mitochondrial	28002	0.29	
IPI00018278	H2AFV Histone H2A.V	13501	0.29	
IPI00329594	CCDC59 Thyroid transcription factor 1-associated protein 26	28652	0.28	
IPI00301323	DDX18 ATP-dependent RNA helicase DDX18	75359	0.27	o
IPI00554715	FXR1 Isoform 2 of Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1	60754	0.27	o
IPI00003886	SNORD19B;GNL3 Isoform 2 of Guanine nucleotide-binding protein-like 3	60503	0.27	o
IPI00419880	SNORD73A;RPS3A 40S ribosomal protein S3a	29926	0.27	o
IPI00013917	RPS12 40S ribosomal protein S12	14505	0.27	
IPI00550021	SNORD43;RPL3 60S ribosomal protein L3	46080	0.26	o
IPI00007797	FABP5 Fatty acid-binding protein, epidermal	15155	0.26	
IPI00010153	RPL23 60S ribosomal protein L23	14856	0.26	
IPI00964214	UTP18 16 kDa protein	15834	0.25	
IPI00182533	RPL28 60S ribosomal protein L28	15738	0.25	
IPI00171611	HIST2H3D;HIST2H3A;HIST2H3C Histone H3.2	15379	0.25	
IPI00411937	SNORD110;SNORD86;NOP56 Nucleolar protein 56	66009	0.24	o
IPI00654755	HBB Hemoglobin subunit beta	15988	0.24	
IPI00008530	RPLP0 60S acidic ribosomal protein P0	34252	0.23	
IPI00235647	FBLL1 rRNA/rRNA 2--O-methyltransferase fibrillar-like protein 1	34654	0.23	o
IPI00009057	G3BP2 Isoform A of Ras GTPase-activating protein-binding protein 2	54088	0.22	
IPI00006987	DDX24 ATP-dependent RNA helicase DDX24	96271	0.21	o
IPI00221394	SNORA56;DKC1 H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4	57638	0.21	o
IPI00455134	HNRNPA3 Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	37006	0.21	o
IPI00396378	HNRNPA2B1 Isoform B1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	37407	0.21	o
IPI01021193	RPL18 Uncharacterized protein	18080	0.21	
IPI00419919	RPL29;RPL29P4 Ribosomal protein L29	17940	0.21	

IPI accession number	Gene symbol	M.W. (Da)	emPAI	nucleolus (UniProt)
IPI00152510	DDX54 Isoform 2 of ATP-dependent RNA helicase DDX54	98605	0.2	o
IPI00059366	H2AFY Isoform 3 of Core histone macro-H2A.1	39464	0.2	
IPI00783872	CAPRIN1 Isoform 1 of Caprin-1	78318	0.2	
IPI00006379	NOP58 Nucleolar protein 58	59541	0.2	o
IPI00008437	RSL24D1 Probable ribosome biogenesis protein RLP24	19608	0.2	o
IPI00300078	PWP2 Periodic tryptophan protein 2 homolog	102387	0.19	o
IPI00294229	RCL1 RNA 3'-terminal phosphate cyclase-like protein	40817	0.19	o
IPI01015917	CCT4 T-complex protein 1 subunit delta	42273	0.19	
IPI00014253	RRS1 Ribosome biogenesis regulatory protein homolog	41168	0.19	o
IPI00413324	RPL17 60S ribosomal protein L17	21383	0.18	
IPI00926109	DHX30 Isoform 2 of Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30	136030	0.17	
IPI00413611	TOP1 DNA topoisomerase 1	90669	0.17	o
IPI00396435	DHX15 Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15	90875	0.17	
IPI00012726	PABPC4 Isoform 1 of Polyadenylate-binding protein 4	70738	0.17	
IPI00013415	RPS7 40S ribosomal protein S7	22113	0.17	o
IPI00025512	HSPB1 Heat shock protein beta-1	22768	0.17	
IPI00302176	GAR1 Isoform 1 of H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 1	22334	0.17	o
IPI00221088	RPS9 40S ribosomal protein S9	22578	0.17	o
IPI00217686	FTSJ3 Putative rRNA methyltransferase 3	96499	0.16	o
IPI00219330	ILF3 Isoform 5 of Interleukin enhancer-binding factor 3	74560	0.16	o
IPI00218343	TUBA1C Tubulin alpha-1C chain	49863	0.16	
IPI00025329	RPL19 60S ribosomal protein L19	23451	0.16	
IPI00304612	SNORD32A,RPL13A:SNORD33:SNORD34 60S ribosomal protein L13a	23562	0.16	
IPI00064765	RPL10L 60S ribosomal protein L10-like	24503	0.16	
IPI00169325	WDR36 WD repeat-containing protein 36	105255	0.15	o
IPI00005675	NKRF NF-kappa-B-repressing factor	77624	0.15	o
IPI00102752	RBM15 Isoform 1 of Putative RNA-binding protein 15	107124	0.15	
IPI00010740	SFPQ Isoform Long of Splicing factor, proline- and glutamine-rich	76102	0.15	
IPI00217862	RRP9 U3 small nucleolar RNA-interacting protein 2	51809	0.15	o
IPI00375226	- Similar to ribosomal protein L18	24907	0.15	
IPI00303813	NOL11 Nucleolar protein 11	81072	0.14	o
IPI00552715	CCT3 T-complex protein 1 subunit gamma isoform c	56395	0.14	
IPI00005613	U2AF1 Splicing factor U2AF 35 kDa subunit	27854	0.14	
IPI00304596	NONO Non-POU domain-containing octamer-binding protein	54197	0.14	
IPI00005024	MYBBP1A Isoform 1 of Myb-binding protein 1A	148762	0.13	o
IPI00013495	ABCF1 Isoform 2 of ATP-binding cassette sub-family F member 1	91623	0.13	
IPI00965993	UTP18 cDNA, FLJ95176, Homo sapiens CGI-48 protein (CGI-48), mRNA	57671	0.13	
IPI00152708	UTP15 U3 small nucleolar RNA-associated protein 15 homolog	58379	0.13	o
IPI00018465	CCT7 T-complex protein 1 subunit eta	59329	0.13	
IPI00293746	C1orf35 Isoform 1 of Multiple myeloma tumor-associated protein 2	29394	0.13	
IPI00376481	CENPV Isoform 3 of Centromere protein V	29712	0.13	
IPI00843786	MOV10 cDNA FLJ13235 fis, clone OVARC1000304, highly similar to PROTEIN MOV-10	64067	0.12	
IPI00658000	IGF2BP3 Isoform 1 of Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3	63666	0.12	
IPI00015905	EXOSC2 Exosome complex component RRP4	32768	0.12	o
IPI00027569	HNRNPCL1 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like 1	32123	0.12	
IPI00013891	TRA2A Isoform Long of Transformer-2 protein homolog alpha	32669	0.12	
IPI00009471	WDR3 WD repeat-containing protein 3	106032	0.11	o
IPI00100151	XRN2 Isoform 1 of 5'-3'- exoribonuclease 2	108513	0.11	o
IPI00396329	RPF2 Ribosome production factor 2 homolog	35560	0.11	o
IPI00003768	PES1 Isoform 1 of Pescadillo homolog	67960	0.11	o
IPI00332428	MAK16 Protein MAK16 homolog	35347	0.11	o
IPI00006196	NUMA1 Isoform 2 of Nuclear mitotic apparatus protein 1	236372	0.1	
IPI00385042	GTPBP4 Nucleolar GTP-binding protein 1	73918	0.1	o
IPI00300127	NAT10 N-acetyltransferase 10	115657	0.1	o
IPI00937477	WDR43 WD repeat-containing protein 43	74843	0.1	o
IPI00216654	NOLC1 Isoform Beta of Nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1	74702	0.1	o
IPI00300531	BAG1 Isoform 1 of BAG family molecular chaperone regulator 1	38755	0.1	
IPI00007856	MYH2 Myosin-2	222906	0.09	
IPI00031554	DDX50 ATP-dependent RNA helicase DDX50	82514	0.09	o
IPI00293655	DDX1 ATP-dependent RNA helicase DDX1	82380	0.09	

IPI accession number	Gene symbol	M.W. (Da)	emPAI	nucleolus (UniProt)
IPI00028955	BOP1 Ribosome biogenesis protein BOP1	83577	0.09	o
IPI00607550	UTP14A U3 small nucleolar RNA-associated protein 14 homolog A isoform 2	81955	0.09	o
IPI00031801	CSDA Isoform 1 of DNA-binding protein A	40066	0.09	
IPI00032374	RRP1B Isoform 2 of Ribosomal RNA processing protein 1 homolog B	82125	0.09	o
IPI00003443	IFI16 Isoform 1 of Gamma-interferon-inducible protein 16	88199	0.09	o
IPI00382516	PRMT1 protein arginine N-methyltransferase 1 isoform 3	40522	0.09	
IPI00844014	C9orf114 Uncharacterized protein C9orf114	41982	0.09	
IPI00026606	SURF6 Surfeit locus protein 6	41426	0.09	o
IPI00024279	HEATR1 HEAT repeat-containing protein 1	242215	0.08	o
IPI00013070	HNRNPUL1 Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1	95679	0.08	
IPI00012535	DNAJA1 DnaJ homolog subfamily A member 1	44839	0.08	
IPI00022256	AP2M1 Isoform 1 of AP-2 complex subunit mu	49623	0.08	
IPI00413173	MKI67 Isoform Short of Antigen KI-67	319248	0.07	o
IPI00010200	YTHDC2 Probable ATP-dependent RNA helicase YTHDC2	160147	0.07	
IPI00220113	MAP4 Isoform 2 of Microtubule-associated protein 4	102842	0.07	
IPI00007752	TUBB2C Tubulin beta-2C chain	49799	0.07	
IPI00000015	SRSF4 Serine/arginine-rich splicing factor 4	56645	0.07	
IPI00004968	PRPF19 Pre-mRNA-processing factor 19	55146	0.07	
IPI00217606	DDX60 Probable ATP-dependent RNA helicase DDX60	197727	0.06	
IPI00001786	USP36 Isoform 2 of Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 36	122832	0.06	o
IPI00034049	UPF1 Isoform 1 of Regulator of nonsense transcripts 1	124267	0.06	
IPI00019463	EIF2AK2 Interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase	62056	0.06	
IPI00328715	MTDH Protein LYRIC	63799	0.06	o
IPI00398625	HRNR Hornerin	282228	0.05	
IPI00006099	BMS1 Ribosome biogenesis protein BMS1 homolog	145716	0.05	o
IPI00299254	EIF5B Eukaryotic translation initiation factor 5B	138742	0.05	
IPI00168885	DHX57 Isoform 1 of Putative ATP-dependent RNA helicase DHX57	155507	0.05	
IPI00012074	HNRNP R Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	70899	0.05	
IPI00018140	SYNCRIP Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	69560	0.05	
IPI00215888	SRP72 Signal recognition particle 72 kDa protein	74560	0.05	o
IPI00021405	LMNA Isoform A of Prelamin-A/C	74095	0.05	
IPI00844270	MICALCL MICAL C-terminal-like protein	77230	0.05	
IPI00217240	WDR75 WD repeat-containing protein 75	94438	0.04	o
IPI00009464	EXOSC10 Isoform 1 of Exosome component 10	100768	0.04	o
IPI00290410	DNTTIP2 Deoxynucleotidyltransferase terminal-interacting protein 2	84418	0.04	
IPI00292894	TSR1 Pre-rRNA-processing protein TSR1 homolog	91752	0.04	o
IPI00025753	DSG1 Desmoglein-1	113676	0.03	
IPI00446753	SSPO Isoform 2 of SCO-spondin	138682	0.03	
IPI00008821	HERC5 E3 ISG15--protein ligase HERC5	116777	0.03	
IPI00170596	SIN3A Paired amphipathic helix protein Sin3a	145085	0.03	o
IPI00337315	RBBP6 Isoform 1 of E3 ubiquitin-protein ligase RBBP6	201442	0.02	o
IPI00954159	AHCTF1P1/AHCTF1 Isoform 1 of Protein ELYS	252342	0.01	
IPI00465361	RPL13 60S ribosomal protein L13	24247	-	
IPI00024006	PIK3R4 Phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 4	153007	-	

表1 質量分析法により同定されたWDR46の結合タンパク質の候補

候補タンパク質をemPAI値の高い順に並べた。UniProtにおいて'Cellular_component'が核小体であるものに印をつけた。核小体の局在が確認されているもので、emPAI値が高いもの上位5種のタンパク質に着目した。着目したタンパク質は表において網掛けで示した。